



HAL
open science

L'oxydation modifie les effets métaboliques d'acides gras polyinsaturés de la série n-3 incorporés par différents vecteurs dans des régimes hyperlipidiques : contribution de l'absorption intestinale et de la réactivité cellulaire du 4-hydroxy-hexéнал

Manar Awada

► **To cite this version:**

Manar Awada. L'oxydation modifie les effets métaboliques d'acides gras polyinsaturés de la série n-3 incorporés par différents vecteurs dans des régimes hyperlipidiques : contribution de l'absorption intestinale et de la réactivité cellulaire du 4-hydroxy-hexéнал. Sciences agricoles. INSA de Lyon, 2012. Français. NNT : 2012ISAL0143 . tel-00833096

HAL Id: tel-00833096

<https://theses.hal.science/tel-00833096>

Submitted on 12 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Présentée devant

L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

Spécialité Biochimie

Par **Manar AWADA**

**L'oxydation modifie les effets métaboliques
d'acides gras polyinsaturés de la série *n-3*
incorporés par différents vecteurs dans des régimes
hyperlipidiques : contribution de l'absorption intestinale et
de la réactivité cellulaire du 4-hydroxy-hexénal**

Directrice de thèse : **Dr. Marie-Caroline MICHALSKI**

Soutenue le **11 Décembre 2012** devant la commission d'examen:

Dr. Françoise GUERAUD	Rapporteur	INRA – Toulouse
Pr. Olivier DANGLES	Rapporteur	Université d'Avignon
Dr. Cécile GLADINE	Examinatrice	INRA – Clermont Ferrand
Pr. Michel LAGARDE	Président	INSA – Lyon
Dr Marie-Caroline MICHALSKI	Directrice de thèse	INRA – Lyon
Dr. Claude GENOT	Membre invité	INRA – Nantes
Dr. Anne MEYNIER	Membre invité	INRA – Nantes

Travail effectué au sein du laboratoire « Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition » (INSERM U 1060) à l'INSA de Lyon.

REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier en tout premier lieu Dr. **Hubert Vidal**, le directeur du laboratoire de recherche **CarMeN**, pour m'avoir accueillie durant ces trois années de thèse.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Dr. **Marie-Caroline Michalski**, pour m'avoir permis de réaliser ce travail, ainsi que pour la confiance qu'elle m'a apportée en me laissant une grande liberté dans la pratique de mon travail de recherche. J'ai également apprécié les discussions que nous avons pu avoir pour essayer de mieux comprendre les résultats expérimentaux et y trouver des interprétations scientifiques rigoureuses. Je la remercie pour sa grande sympathie, pour ses conseils, et son attention qu'elle a apportés à la réalisation de cette recherche. Je la remercie finalement pour son amitié, je ne garderai que les bons souvenirs, en particulier pendant nos voyages aux Etats-Unis et en Pologne.*

Je remercie également l'Agence National de la Recherche qui a financé ce projet.

*Mes vifs remerciements s'adressent au Pr. **Michel Lagarde** qui m'a fait l'honneur d'être le président du jury de ma thèse, et pour ses conseils avisés pour améliorer ce travail et ce document.*

*J'adresse mes respectueux-remerciements aux deux rapporteurs Dr. **Françoise Guéraud** et Pr. **Olivier Dangles**, et les membres du jury : Dr. **Cécile Gladine**, Dr. **Claude Genot** et Dr. **Anne Meynier**, qui m'ont fait l'honneur de juger ces trois années de recherche. Ils ont également contribué par leurs remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire.*

*Je tiens également à remercier les membres de mon **comité de thèse** pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour les critiques constructives qu'ils ont faites sur mon projet de thèse.*

*Je remercie Dr. **Claude Genot** et Dr. **Anne Meynier** qui ont initié et ont collaboré d'une manière très efficace à ce travail. Je tiens à remercier vivement **Lucie, Michèle, Hernan et Tin-Hanin** pour leur aide et leur encouragement. Merci pour les bons moments passés ensemble malgré le court séjour lors de chaque réunion du projet.*

*Je remercie vivement Dr. **Christophe Soulage**, Pr. **Michel Guichardant**, Dr. **Cyrille Debard**, Dr. **Alain Géloën**, et Dr. **Pascale Plaisancié** pour leurs précieux conseils scientifiques et leur implication efficace dans ce travail.*

*Je remercie **Patricia Daira** qui m'a appris les techniques de dosages lipidiques, **Marie-Agnès Chauvin** et **Monique Estienne** qui m'ont appris la culture cellulaire.*

*Je remercie également les stagiaires : **Benjamin Gautier** et **Grégory Picard** qui ont contribué à l'avancement de mes travaux.*

*Un grand merci à **Béregère**, je la remercie très chaleureusement pour son amitié, son soutien et son apport scientifique. Merci pour m'avoir toujours fait confiance en me faisant participer à ses réflexions scientifiques, de m'avoir conseillée, soutenue et critiquée dans mon travail. Je tiens également à remercier **Lilas** pour son amitié, son soutien depuis mon arrivée au laboratoire et sa bonne humeur. Merci à **Fabienne** pour son soutien et ses encouragements. Merci à **Elodie** pour les discussions fructueuses que nous avons partagées et pour son amitié malgré son court séjour au laboratoire.*

*Merci aussi à mes collègues au laboratoire pour leur apport et les bons moments passés ensemble (**Romain C, Marine, Roxane, Miao, Baptiste, Patricia, Gaëlle, Huy...**). Je remercie tous les permanents du laboratoire qui ont apporté une aide de près ou de loin à ce travail et pour leur sympathie.*

*Merci à mes amis que j'aime du fond du cœur (**Roumayssaa, Rania, Souad, Mayssa, Zeinab G, Nadine, Lina, Jalal, Mohamad J..**). Merci pour l'amitié qui nous lie depuis toutes ces années. En souvenir à tous ces moments mémorables de joie que nous avons partagés, mais aussi un peu les moments difficiles !*

*Je voudrais remercier les personnes les plus importants à mes yeux, sans eux rien de tout cela n'aurait été possible, à savoir : **mes chers parents, ma sœur, mes deux frères, ma cousine Hanan et ma famille**. Merci pour leur amour, leur confiance, leur encouragement et leur inquiétude sur le bon déroulement de mes études.*

*Et pour terminer, je remercie mon amour et mon mari **Ahmad** pour sa grande patience, ses nombreux encouragements et ses précieux conseils durant mes trois années de thèse. Son esprit scientifique toujours en éveil m'a parfois aidée lors de cette thèse. MERCI !!*

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quadriennal 2007-2010

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://sakura.cpe.fr/ED206	M. Jean Marc LANCELIN , Université Claude Bernard Lyon 1, Bât CPE, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 Email : lancelin@hikari.cpe.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://www.insa-lyon.fr/eea	M. Alain NICOLAS, Ecole Centrale de Lyon, Bâtiment H9, 36 avenue Guy de Collongue, 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 Email: eea@ec-lyon.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE http://ediss.univ-lyon1.fr	M. Didier REVEL, Hôpital Cardiologique de Lyon, Bâtiment Central, 28 Avenue Doyen Lépine, 69500 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 Email :Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFO MATHS	INFORMATIQUE ET MATHEMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr	M. Alain MILLE, Université Claude Bernard Lyon 1, LIRIS – INFOMATHS, Bâtiment Nautibus, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44 82 94 Fax 04 72 43 13 10 Email : alain.mille@liris.cnrs.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON http://edlm.ec-lyon.fr	M. Jean Marc PELLETIER, INSA de Lyon, MATEIS, Bâtiment Blaise Pascal, 7 avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Email :Jean-marc.Pelletier@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://mega.ec-lyon.fr	M. Jean Louis GUYADER, INSA de Lyon, Laboratoire de Vibrations et Acoustique, Bâtiment Antoine de Saint Exupéry, 25 bis avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.18.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Email : mega@lva.insa-lyon.fr
ScSo	ScSo*	M. Lionel OBADIA, Université Lyon 2, 86 rue Pasteur, 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.88 Fax : 04.37.28.04.48 Email : Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie.

Avant-propos

Le travail exposé dans ce mémoire a fait l'objet de publications scientifiques et a été présenté par communications orales ou affichées lors de congrès scientifiques nationaux et internationaux.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Awada M.**, Meynier A., Soulage CO., Hadji L., Géléön A., Viau M., Ribourg L., Debard C., Benoit B., Guichardant M., Lagarde M., Genot C., Michalski M.C., **n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice.** *Nutr & Metab*, 10, 23 (2013)
- **Awada M.**, Soulage CO., Meynier A., Debard C., Plaisancié P., Benoit B., Picard G., Loizon E., Chauvin M.A., Estienne M., Peretti N., Guichardant M., Lagarde M., Genot C., Michalski M.C., **Dietary oxidized n-3 PUFA induce carbonyl stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells.** *J lipid Res* 50, 2069-2080 (2012)
- Harmel E., **Awada M.**, Peretti N., Vidal H., Michalski M.C., Levy E., Laville M., **Crosstalk between the AMPK and insulin signaling pathways is able to reduce glucose uptake by intestinal Caco-2 cells but not in HHE induced insulin-resistant state.** *Cell Physiol Biochem* (2012, en révision)
- Benoit B., Plaisancié P., **Awada M.**, Geloën A., Estienne M., Capel F., Malpuech-Brugere C., Debard C., Pesenti S., Morio B., Vidal H., Rieusset J., Michalski M.C., **Metabolic effects of high-fat diet in mice: where choosing the control low-fat diet really matters.** *Nutrition Research* (2013, soumise).

COMMUNICATIONS ORALES

- **Awada M.**, Meynier A., Soulage CO., Guichardant M., Genot C., Michalski M.C. **Les acides gras polyinsaturés ω 3 oxydés induisent un stress oxydant et une inflammation chez la souris aux niveaux plasmatique et intestinal.** *10èmes Journées Francophones de Nutrition*. Lyon, France. Décembre 2012.
- **Awada M.**, Meynier A., Soulage CO., Guichardant M., Genot C., Michalski M.C. **Oxidation of dietary polyunsaturated fatty acids: intestinal absorption of end-products and metabolic impact.** *Euro fed Lipid*. Cracovie, Pologne, Septembre 2012.
- **Awada M.**, Meynier A., Soulage CO., Benoit B., Guichardant M., Genot C., Michalski M.C. **End products of polyunsaturated fatty acids oxidation: intestinal absorption and metabolic impact.** *AOCS; American Oil Chemists' Society*. California, États-Unis, Mai 2012.
- Genot C., Meynier A., Kenmogne-Domguia H., **Awada M.**, Michalski M.C., **Oxidative fate of unsaturated lipids in food and during digestion: Possible Metabolic Significance.** *AOCS; American Oil Chemists' Society*. California, États-Unis, Mai 2012.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- **Awada M.**, Meynier A., Soulage CO., Benoit B., Guichardant M., Genot C., Michalski M.C., **Produits d'oxydation des acides gras polyinsaturés alimentaires : absorption intestinale et effets sur le stress oxydant métabolique.** *9èmes Journées Francophones de Nutrition*. Reims, France. Décembre 2011.
- **Awada M.**, Guichardant M., Michalski M.C., **Absorption of lipid peroxidation-derived products by a humain intestinal epithelium Caco-2/TC7.** *AOCS annual meeting*. Ohio, États-Unis. Mai 2011.
- **Awada M.**, Guichardant M., Michalski M.C., **Lipid peroxidation-derived products: absorption by a humain intestinal epithelium Caco-2/TC7 and impact on inflammation.** *11ème journée de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)*. Montpellier, France. Juin 2011.
- **Awada M.**, Guichardant M., Michalski M.C., **Absorption de composés d'oxydation des AGPI par les cellules intestinales Caco-2 et impact métabolique.** *15ème journée de l'EDISS*. Villeurbanne, France. Mars 2011.

Table des matières

Avant-propos	2
Table des matières	4
Liste des abréviations	8
Résumé	10
Summary	11
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Introduction générale	15
Chapitre I. Contexte bibliographique	18
I. Les maladies métaboliques sont associées à l'inflammation et au stress oxydant.....	18
I.1. L'inflammation à bas bruit.....	18
I.1.1. Rôle de l'inflammation à bas bruit dans la progression des maladies métaboliques..	18
I.1.2. NF- κ B et inflammation.....	20
I.1.3. Voie de signalisation de NF- κ B.....	21
I.2. Le stress oxydant dans les maladies métaboliques.....	22
I.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	23
I.2.2. Les défenses antioxydantes.....	24
I.3. Stress du réticulum endoplasmique et maladies métaboliques.....	27
I.3.1. La réponse UPR.....	28
I.3.2. Stress du RE et maladies métaboliques.....	29
II. Les lipides alimentaires et leur digestion.....	32
II.1. Structures moléculaires.....	32
II.1.1. Structure moléculaire des acides gras.....	32
II.1.2. Structure des molécules vectrices des acides gras.....	34
II.2. Digestion des lipides.....	35
II.3. Physiologie de l'intestin grêle.....	36
II.4. Absorption intestinale des lipides.....	38
II.4.1. Captage entérocytaire des lipides.....	39
II.4.2. Métabolisme intra-entérocytaire des lipides.....	40
II.4.3. Assemblage et sécrétion des chylomicrons.....	42

II.5. Un modèle cellulaire d'étude: Caco-2/TC7.....	45
III. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne : essentiels mais sensibles à l'oxydation....	47
III.1. Sources et métabolisme des AGPI.....	47
III.2. La peroxydation lipidique des AGPI : mécanisme et produits générés.....	49
III.3. Les 4-hydroxy-alkénals.....	52
III.3.1. Structure	52
III.3.2. Réactivité.....	53
III.3.3. Métabolisme.....	54
III.3.4. 4-hydroxy-hexénal (4-HHE).....	55
III.3.5. 4-hydroxy-nonénal (4-HNE).....	56
IV. Effets des AGPI sur les marqueurs du syndrome métabolique et implication de leurs produits d'oxydation.....	59
IV.1. Effets bénéfiques des AGPI <i>n</i> -3 sur la santé.....	59
IV.2. Impact métabolique des molécules vectrices d'AGPI <i>n</i> -3.....	59
IV.3. Impact des AGPI à longue chaîne sur le stress oxydant métabolique.....	60
IV.4. Impact métabolique de l'absorption intestinale en AGPI oxydés et de leurs produits d'oxydation.....	63
IV.4.1. Teneur en 4-hydroxy-alkénals dosés dans les aliments.....	63
IV.4.2. Devenir des produits d'oxydation des AGPI.....	65
IV.4.3. Effets délétères des produits d'oxydation des AGPI.....	66
IV.5. Impact possible des 4-hydroxy-alkénals sur le stress oxydant métabolique.....	67
Objectif de la thèse.....	69
Chapitre II. Matériels & Méthodes.....	71
I. Matériels.....	71
II. Protocole animal.....	71
II.1. Animaux et régimes.....	71
II.2. Formulation des mélanges de matières premières lipidiques pour leur incorporation dans les régimes des souris.....	72
II.3. Dosages plasmatiques.....	75
II.4. Immunohistologie.....	76
II.5. Etude de gavage.....	76
III. Protocole cellulaire.....	77
III.1. Culture cellulaire.....	77
III.2. Incubation des Caco-2 /TC7 Avec des 4-hydroxy-alkénals (4-HHE et 4-HNE) seuls ou en présence de micelles mixtes lipidiques.....	77
III.3. Mesure des concentrations en 4-hydroxy-alkénals libres dans les milieux d'incubation des cellules.....	78

III.4. Mesure de la résistivité trans-épithéliale TEER.....	79
III.5. Test de LDH.....	80
III.6. Carbonylation des protéines.....	81
III.7. Production d'espèces radicalaires de l'oxygène.....	82
III.8. Dosage des triglycérides dans le milieu basolatéral.....	82
III.9. Microscopie électronique.....	82
III.10. Mesure du diamètre hydrodynamique des chylomicron.....	83
IV. Analyse des lipides.....	84
IV.1. Dosage des 4-hydroxy-alkénals par chromatographie gazeuse couplée à spectrométrie de masse.....	84
IV.2. Analyse des acides gras par chromatographie gazeuse.....	85
V. Mesure de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel.....	86
V.1. Extraction des ARN totaux.....	86
V.2. Transcription inverse (RT).....	87
V.3. PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	87
VI. Expression protéique dans les caco-2/TC7 et dans l'intestin grêle des souris.....	88
VI.1. Extraction des protéines des Caco-2/TC7 et de l'intestin grêle des souris.....	88
VI.2. Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques des Caco-2/TC7.....	89
VI.3. Western blotting.....	89
VI.4. Dot blotting.....	90
VII. Statistiques.....	90
Chapitre III. Publication 1	92
Résumé.....	92
I. Background.....	95
II. Materials & Methods.....	96
III. Results.....	102
III.1. Diet compositions.....	102
III.2. PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet modify biometric parameters.....	103
III.3. Fatty acid composition in plasma and tissues reflects the enrichment with PL- ω 3 and TG- ω 3 in the high-fat diets.....	105
III.4. Effects of PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet on plasma markers of inflammation, metabolic endotoxemia and oxidative stress.....	107
III.5. PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet improve markers related to inflammation and oxidative stress in WAT.....	109
III.6. PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet affect adipocyte size distribution in WAT differently.....	109

III.7. Effect of PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet on oxidative stress in the small intestine	112
IV. Discussion	113
V. References	119
Chapitre IV. Publication 2	127
Résumé	127
I. Introduction	131
II. Materials & Methods	133
III. Results	140
III.1. Diet compositions and biometric data	140
III.2. Aldehyde stress and inflammatory markers in plasma of mice fed oxidized <i>n</i> -3 diets	142
III.3. Effects of oxidized diets on markers of stress and inflammation in the small intestine	144
III.4. Kinetics of intestinal absorption of 4-HHE in mice and protein modifications in the small intestine	146
III.5. Absorption of 4-hydroxy-2-alkenals in vitro by Caco-2/TC7 cells	147
III.6. Protein modifications by 4-hydroxy-2-alkenals in Caco-2/TC7 cells	148
III.7. GPx2 and ER stress-linked gene expression in Caco-2/TC7 cells	150
IV. Discussion	151
V. References	155
Chapitre V. Résultats complémentaires	161
I. Effets des 4-hydroxy-alkénals sur le stress oxydant et l'inflammation	161
I.1. Effet des 4-hydroxy-alkénals sur la production de ROS	161
I.2. Effets des 4-hydroxy-alkénals sur l'autophagie	163
I.3. Effet des 4-hydroxy-alkénals sur NFkappaB	165
II. Effets des 4-hydroxyalkénals sur la lipogenèse	166
II.1. Dosage des 4-hydroxy-alkénals dans le milieu basolatéral	166
II.2. Activation de l'ACC par les 4-hydroxy-alkénals	167
II.3. Effets des 4-hydroxy-alkénals sur la lipémie	169
Conclusion & Perspectives	173
Références bibliographiques	177
Annexes	195

Liste des abréviations

- 4-HHE : 4-hydroxy-2-hexéanal
4-HNE : 4-hydroxy-nonéanal
4-OHE : 4-oxo-hexéanal
AA : Acide arachidonique
ACC : Acétyl-coenzyme A carboxylase
AG : Acide gras
AGL : Acide gras libre
AGPI : Acide gras polyinsaturé
ALA : Acide alpha linoléinique
Apo : Apo lipoprotéine
CAT : Catalase
CHOP : C/EBP protéine homologue
CRP : C-Reactive Protein
DG : Diacylglycérol
DCFDA : Dichlorofluorescein diacetate, sonde fluorescente utilisée pour mesurer les ROS
DHA : Acide docosahexaénoïque
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
DMSO : Dimethyl Sulfoxide
DNPH : Dinitrophenyl hydrazine
DTT : Dithiothreitol
EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid
EPA : Acide eicosapentaénoïque
FABPpm : Plasma membrane Fatty acid binding protein
FAT : fatty acid transporter
GC : Gas Chromatography (Chromatographie en phase gazeuse)
GC/MS « Gas Chromatography-Mass Spectrometry » (Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse)
GPx : Glutathion Peroxydase

GRP78 : Glucose regulated protein 78
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
IL : Interleukine
IRS : Insulin Receptor Substrate
JNK : c-jun N-terminal Kinase
LA : Acide linoléique
LDH : lactate déshydrogénase
LPL : Lipoprotéine lipase
LPS : Lipopolysaccharides
LSD : Lysergic acid diethylamide (pour l'extraction des protéines)
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MCP1 : Monocyte Chemotactic Protein 1
MDA : Dialdéhyde malonique (malondialdehyde)
MG : Monoacylglycérol
MTP : Microsomal triglyceride transfert protein
NAD⁺ / NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (oxydé/réduit)
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
PBS : Phosphate buffer saline
PL : Phospholipides
PVDF : Polyvinylidene fluoride
RE : Réticulum endoplasmique
RIPA : Milieu permettant de lyser les cellules (extraction protéine)
ROS : Espèces radicalaires de l'oxygène (reactive oxygen species)
SDS – PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis
SOD : Superoxyde Dismutase
TEER : Résistivité trans-épithéliale
TG : Triglycérides
TNFα : Tumor Necrosis Factor Alpha
VLDL : Very Low Density Lipoproteins (lipoprotéines de très basse densité)
UPR : Unfolded Protein Response

Résumé

Les aliments riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne (LC) de la série *n*-3 sont recommandés pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine et en particulier dans la prévention du développement des maladies métaboliques. Or, la biodisponibilité de ces AGPI et leur impact métabolique pourraient être modulés par la nature chimique des molécules qui les véhiculent dans les aliments (triacylglycérols, TG ou phospholipides, PL). De plus, ces AGPI sont sensibles à la peroxydation lipidique. S'ils ne sont pas protégés de l'oxydation, ils peuvent former des espèces réactives toxiques comme le 4-hydroxy-hexéanal (4-HHE). Dans ce contexte, le but de notre étude a été d'évaluer l'impact de l'enrichissement de régimes hyperlipidiques en AGPI *n*-3 (i) portés par des TG ou des PL et (ii) sous forme non-oxydée ou oxydée, sur l'inflammation et le stress oxydant métaboliques et d'en comprendre certains mécanismes liés à l'absorption intestinale et la réactivité du 4-HHE.

D'une part, notre étude a confirmé que la consommation d'AGPI-LC *n*-3 empêche l'induction du stress oxydant et de l'inflammation lors d'un régime hyperlipidique chez la souris. Cependant, par rapport aux TG, les PL vecteurs d'AGPI *n*-3 permettent de réduire la taille des adipocytes et de stimuler le système antioxydant.

D'autre part, notre étude a montré que la consommation d'AGPI *n*-3 oxydés de manière modérée aboutit à une élévation des concentrations plasmatiques de 4-HHE et des marqueurs inflammatoires. De plus, une activation des voies inflammatoires ainsi que du stress du réticulum endoplasmique ont été détectées au niveau de l'intestin grêle. Nos résultats *in vivo* et *in vitro* sur cellules intestinales Caco-2/TC7 indiquent que cela peut être dû en partie à une absorption au niveau intestinal du 4-HHE, produit d'oxydations des AGPI *n*-3.

Dans le contexte du développement des aliments contenant des AGPI-LC *n*-3, nos résultats contribuent à identifier les structures vectrices de ces acides gras les plus efficaces du point de vue métabolique. En santé publique et en pratique clinique, nos résultats constituent une nouvelle base de réflexion pour la mise en place de bonnes pratiques de production et de conservation des aliments et des compléments nutritionnels enrichis en AGPI-LC *n*-3 pour éviter leur oxydation et ses possibles effets délétères.

Mots-clés : Acides gras polyinsaturés *n*-3, triacylglycérols, phospholipides, inflammation, stress oxydant, 4-HHE, peroxydation lipidique.

Summary

Dietary intake of *n*-3 long chain (LC) polyunsaturated fatty acids (PUFA) are recommended for their beneficial effects on human health, especially to prevent the development of metabolic diseases. However, the bioavailability of these PUFAs and their metabolic impact could be modulated by their chemical carriers (triacylglycerols, TG or phospholipids, PL). In addition, these PUFA are susceptible to lipid peroxidation. If they are not protected from oxidation, they can form toxic reactive species such as 4-hydroxy-hexenal (4-HHE). In this context, the aim of our study was to evaluate the impact of enriching high-fat diets with *n*-3 PUFA (i) bound to TG or PL and (ii) in unoxidized or oxidized form on the generation of inflammation and oxidative stress, and to understand some underlying mechanisms associated with intestinal absorption and reactivity of 4-HHE.

On the one hand, our study confirmed in mice that the consumption of *n*-3 PUFA protects against oxidative stress and inflammation induced by high-fat diets. However, compared to TG, *n*-3 PUFA in the form of PL reduce the size of adipocytes and stimulate the antioxidant system.

On the other hand, our study showed that the consumption of moderately oxidized *n*-3 PUFA results in increased plasma concentrations of 4-HHE and of inflammatory markers. In addition, activation of inflammatory pathways as well as endoplasmic reticulum stress were detected in the small intestine. Our results *in vivo* and *in vitro*, using intestinal Caco-2/TC7 cells, indicate that this can be partly due to the intestinal absorption of the end-product of *n*-3 PUFA oxidation, 4-HHE.

In the context of the development of foods containing LC *n*-3 PUFA, our results contribute to identify the most effective PUFA carriers on a metabolic standpoint. Regarding public health and clinical practice, our results provide new basis for the set up of best practices regarding production and storage of food and supplements enriched with LC *n*-3 PUFA to avoid their lipid oxidation and its possible deleterious effects.

Keywords: *n*-3 polyunsaturated fatty acids, triacylglycerols, phospholipids, inflammation, oxidative stress, 4-HHE, lipid peroxidation.

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure 1: Obésité, développement de l'inflammation et de l'insulino-résistance dans le foie, le tissu adipeux et les muscles	20
Figure 2: NF- κ B est un centre régulateur en réponse au stress cellulaire.....	21
Figure 3: Mode d'action de la GPx.....	25
Figure 4: Structure de glutamylcysteinylglycine (GSH).....	26
Figure 5: Rôle de GSH dans la génération des vitamines E et C	27
Figure 6: Réponse UPR au stress du réticulum endoplasmique	29
Figure 7: Un modèle proposé pour l'implication du stress du RE dans l'activation de NF- κ B et la production de ROS.....	31
Figure 8: Structure chimique de quelques acides gras	34
Figure 9: Structure chimique des TG et PL.	35
Figure 10: Structure de l'unité fonctionnelle d'une cellule épithéliale.....	38
Figure 11: Voies de ré-estérification des lipides au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique..	41
Figure 12: Absorption intestinale des lipides.....	43
Figure 13: Transport des lipides alimentaires après absorption intestinale vers le foie, les muscles et les tissus adipeux.	44
Figure 14: Cellule Caco-2/TC7 observée sur une microscopie électronique.....	47
Figure 15: Schéma décrivant le processus de l'oxydation des lipides.	51
Figure 16: Les 4-hydroxy-yalkénals, des produits secondaires de l'oxydation des acides gras polyinsaturés <i>n</i> -6 et <i>n</i> -3 très réactifs.	52
Figure 17: Structure chimique des 4-hydroxy-alkénals.	53
Figure 18: Mécanisme d'adduction de Michael par les 4-hydroxy-alkénals.....	54
Figure 19: Schéma décrivant la problématique de cette étude.....	70

CHAPITRE II

Figure 1: Dosage de 4-HNE dans le milieu de culture DMEM.....	79
Figure 2: Dosage de 4-HHE dans le milieu de culture DMEM.	79
Figure 3: Exemple d'un résultat montrant la courbe d'intensité en fonction du diamètre d'un chylomicron	84

CHAPITRE V

Figure 1: Production des espèces radicalaires de l'oxygène par le 4-HNE ou le 4-HHE.....	162
Figure 2: Observation en microscopie électronique à transmission de cellules autophagiques après traitement des Caco-2/TC7 avec de 4-HNE ou de 4-HHE.	164
Figure 3: Effet de 4-HNE et de 4-HHE sur la voie d'activation de NF- κ B	165
Figure 4: Concentration de 4-HHE et de 4-HNE dans le milieu basal (nM)	167
Figure 5: Activation de l'acétyl-coenzyme A carboxylase par le 4-HNE et le 4-HHE	168
Figure 6: Activation de la protéine apolipoprotéine B-48 par le 4-HNE et le 4-HHE.....	169
Figure 7: Augmentation de la sécrétion des triglycérides dans le milieu basal des Caco-2/TC7 par le 4-HNE et le 4-HHE.	170
Figure 8: Diamètre hydrodynamique des chylomicrons sécrétés par les Caco-2/TC7	171

Liste des tableaux

CHAPITRE I

Tableau 1 : Classification et nomenclature des acides gras les plus courants.....	33
Tableau 2 : Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI pour un adulte consommateur de 2000 Kcal.	49
Tableau 3 : Etudes relatant des effets des AGPI-LC <i>n-3</i> sur des marqueurs associés au stress oxydant.	63
Tableau 4 : Etudes traitant de conséquences de la consommation d'AGPI oxydés sur l'organisme.....	67

CHAPITRE II

Tableau 1 : Composition de quatre régimes high-fat supplémentés en AGPI <i>n-3</i> oxydés ou non et portés par PL ou TG	73
Tableau 2 : Composition de deux régimes low fat (LF) et high-fat (HF)	74

Introduction générale



Introduction générale

Dans les pays industrialisés, la prévalence de l'obésité est en augmentation continue chez l'adulte. Actuellement, la prévalence de l'obésité en France se situe entre 11 et 13% contre 6% en 1980 (AFSSA 2009). A ce constat alarmant s'ajoute une prévalence croissante du diabète de type 2 qui touche 3,1 % de la population et s'accroît de 4,8% par an (CNAM 1999). Le coût global des soins aux patients est estimé à 4,9 milliards d'euros soit 4,7% des dépenses de l'assurance maladie (Ricordeau, Weill et al. 2000). Le développement de ces maladies est étroitement lié au mode de vie sédentaire de la population associé aux déséquilibres alimentaires et à une consommation accrue de graisses alimentaires. Cette situation entraîne des coûts non négligeables pour les systèmes de santé. Ces pathologies interviennent notamment dans l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires et l'importance des lipides consommés est beaucoup étudiée dans ce contexte.

Les lipides alimentaires sont de nutriments essentiels contenant une grande variété d'acides gras notamment des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille des *n-3* et *n-6*, (couramment appelés oméga 3 et des oméga 6). Depuis les années 1970, les AGPI ont fait l'objet de nombreuses études du fait qu'ils sont associés à des effets bénéfiques dans certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, les troubles inflammatoires, les maladies neurodégénératives, le cancer et le diabète de type II. C'est pourquoi les recommandations nutritionnelles actuelles préconisent d'augmenter la part relative des acides gras polyinsaturés, et plus particulièrement des acides gras de la série *n-3*, dans l'alimentation. Ces apports doivent comprendre, en particulier pour les populations à risque comme les seniors, non seulement de l'acide alpha-linolénique (C18:3 *n-3*), indispensable, mais aussi des acides gras à longue chaîne, comme l'EPA (C20:5 *n-3*) et le DHA (C22:6 *n-3*).

Nous devons toutefois souligner que plus un aliment est riche en AGPI, plus les risques qu'il contienne des lipides oxydés, potentiellement toxiques, sont élevés compte tenu de la sensibilité à l'oxydation de ces molécules. Heureusement, l'odeur résultant de l'oxydation des lipides empêche généralement le consommateur d'ingérer des produits trop riches en produits

peroxydés. Cependant, les risques liés à une consommation en quantité faible mais régulière de produits peroxydés *via* l'alimentation, dans des aliments où les odeurs seraient masquées ou *via* la consommation de suppléments contenant des AGPI, sont encore très peu étudiés. En effet, à l'heure actuelle, les quantités de produits issus de l'oxydation des lipides consommés avec les aliments sont peu connues de même que les effets biologiques de leur ingestion.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet **AGECANINOX**. Ce projet a pour but d'étudier et de quantifier, grâce au développement de méthodes adaptées du domaine biologique, certains marqueurs de l'oxydation des AGPI depuis les matières premières jusqu'à la consommation d'un aliment en s'intéressant à leur devenir et leurs effets métaboliques *in vivo* et en s'assurant de l'acceptabilité sensorielle des aliments formulés.

Dans le cadre de ce projet, nos travaux ont porté plus particulièrement sur deux aspects. D'une part, nous avons cherché à évaluer *in vivo* l'impact de la consommation d'AGPI *n-3* à longue chaîne sur le stress oxydant et l'inflammation dans un contexte de régime hyperlipidique, en se plaçant dans différentes situations d'apports alimentaires observées en pratique : (i) AGPI *n-3* véhiculés soit sous forme de triglycérides (TG) soit sous forme de phospholipides (PL) et (ii) sans induction d'oxydation ou modérément oxydés. D'autre part, nous avons évalué *in vitro* sur un modèle cellulaire d'absorption intestinale humaine, les Caco-2/TC7 les conséquences de l'absorption de deux marqueurs d'oxydation des AGPI alimentaires au niveau intestinal.

Pour mieux expliquer tous les travaux qui sont faits durant cette thèse, ce manuscrit s'articule autour de quatre parties :

Une première partie, étude bibliographique, introduit (i) les maladies métaboliques liées à l'inflammation et au stress oxydant, puis (ii) l'absorption des lipides, (iii) les acides gras polyinsaturés et leurs produits d'oxydation et enfin (iv) les effets des AGPI sur les marqueurs du syndrome métabolique et l'implication de leurs produits d'oxydation dans ce contexte pathologique.

Une deuxième partie décrit les matériels et méthodes utilisés lors du travail expérimental.

Une troisième partie expose les résultats et les discussions. Elle comporte un premier chapitre portant sur (i) l'impact de la consommation des AGPI *n-3* sous forme de TG ou PL sur l'adiposité, l'inflammation et le stress oxydant chez les souris et (ii) l'influence de la

nature des molécules vectrices d'AGPI $n-3$ sur ces paramètres. Un deuxième chapitre porte sur l'impact de la consommation des AGPI $n-3$ oxydés et de leurs produits d'oxydation sur les paramètres métaboliques. Celui-ci comprend deux études *in vivo* et une étude *in vitro* sur les cellules intestinales Caco-2/TC7. Enfin, un dernier chapitre comporte les résultats complémentaires obtenus au cours de l'étude *in vitro*.

Une quatrième et dernière partie donne une conclusion à l'ensemble de ces travaux et ouvrant sur plusieurs perspectives.

CHAPITRE I

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les maladies métaboliques sont associées à l'inflammation et au stress oxydant

Depuis peu, l'inflammation et le stress oxydant sont reconnus par la communauté scientifique comme des facteurs importants intervenant dans la genèse de différentes pathologies comme les maladies métaboliques, les maladies cardiovasculaires et le vieillissement.

I.1. L'inflammation à bas bruit

Le syndrome métabolique, l'obésité et le diabète de type II, principales maladies métaboliques rencontrées dans nos sociétés occidentales, sont caractérisées par un niveau faible mais constant de cytokines pro-inflammatoires circulantes, on parle d'inflammation à bas bruit. De nombreuses études s'intéressent actuellement à l'impact de ces cytokines circulantes dans le cadre des pathologies métaboliques afin de trouver des stratégies adaptatives permettant ainsi de lutter contre ce phénomène d'inflammation à bas bruit.

I.1.1. Rôle de l'inflammation à bas bruit dans la progression des maladies métaboliques

L'inflammation à bas bruit est considérée actuellement comme un facteur de risque de développer des maladies métaboliques chroniques. Au cours de la dernière décennie, un grand nombre de travaux chez l'Homme et les rongeurs ont montré l'implication de l'inflammation à bas bruit dans la progression des maladies métaboliques. Pour caractériser cette inflammation, différents marqueurs sont systématiquement étudiés : des cytokines pro-inflammatoires telles que le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) et l'interleukine 6 (IL-6); des chémokines comme le Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1) ainsi que des protéines circulantes comme la protéine réactive C (CRP).

Cette inflammation à bas bruit n'est pas exclusivement circulatoire, elle touche également des tissus parmi lesquels le tissu adipeux. En effet, le tissu adipeux, en plus de son implication dans le métabolisme énergétique et le système endocrinien, joue un rôle important dans la physiopathologie de l'inflammation. Il produit et sécrète plusieurs types de marqueurs de l'inflammation tels que des adipokines comme la leptine, la résistine, et l'adiponectine; des cytokines comme le TNF α et l'IL-6 et des chémokines pro-inflammatoires comme MCP1 (Ouchi, Parker et al. 2011). Plusieurs études publiées ont montré une augmentation de

l'expression du TNF α et de l'IL-6 dans le plasma et le tissu adipeux de sujets humains insulino-résistants (Hotamisligil and Spiegelman 1994; Hotamisligil, Arner et al. 1995; Roytblat, Rachinsky et al. 2000). D'autres études rapportent une élévation de concentration de la CRP chez des sujets obèses et diabétiques (Visser, Bouter et al. 1999; Horakova, Pastucha et al. 2011). Dans le même contexte, des études réalisées sur des sujets obèses humains et rongeurs ont montré que le tissu adipeux de ces sujets présentait une forte infiltration macrophagique. Ces études ont également montré que ces macrophages sont fortement capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6) en réponse à un stimulus (Weisberg, McCann et al. 2003; Cinti, Mitchell et al. 2005). De plus, les tissus adipeux de ces sujets montraient une forte concentration de MCP-1, protéine synthétisée par le tissu adipeux lui-même pour attirer les monocytes circulants.

Les cytokines pro-inflammatoires, en cas de production continue et à faible dose, peuvent être à l'origine d'une altération de la transduction du signal de l'insuline. Elles exerceraient leur action très précocement dans la voie de signalisation de l'insuline en favorisant la phosphorylation des résidus sérine des récepteurs à l'insuline (IRS-1) empêchant la phosphorylation sur les résidus tyrosine nécessaire à la transduction du signal de l'insuline (Capeau 2003). Le tissu adipeux, les muscles et le foie sont les tissus les plus concernés par cette insulino-résistance.

Par ailleurs, certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α sont capables d'accroître la lipolyse au niveau de l'adipocyte ce qui entraîne une augmentation de la libération d'acides gras libres (AGL) dans la circulation sanguine. Ces derniers, très nombreux, s'accumulent dans les cellules des muscles et du foie (**Figure 1**) (de Luca and Olefsky 2008; Guilherme, Virbasius et al. 2008) et de tels dépôts ectopiques exercent des effets délétères sur la signalisation insulinique. Les mécanismes moléculaires par lesquels les AGL provoquent cette insulino-résistance semblent être communs à ceux exercés par les cytokines. La deuxième conséquence de ce passage massif des AGL dans les cellules est une hyper-insulinémie compensatrice due à l'augmentation de la glycémie suite au défaut de captage du glucose par les cellules cibles. Les pathologies qui en résultent sont une stéatose hépatique (accumulation de lipides dans les cellules hépatiques) et une intolérance au glucose conduisant ainsi au diabète de type II souvent associé aux maladies cardiovasculaires.

Les AGL peuvent également exercer leurs effets délétères sur la voie de signalisation insulinique par deux autres voies : soit en activant les récepteurs «toll-like» (TLR) conduisant ainsi à la production de cytokines pro-inflammatoires, soit en activant directement des protéines kinases

telles que Jun N-terminal Kinase (JNK) et Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK). L'aboutissement de ces deux voies est la phosphorylation des résidus sérines des protéines IRS-1. Un autre point commun entre ces deux voies réside dans l'activation du facteur de transcription NF- κ B. La voie de transduction du signal de NF- κ B est bien étudiée du fait de son rôle clé dans la régulation de divers gènes pro-inflammatoires et apoptiques.

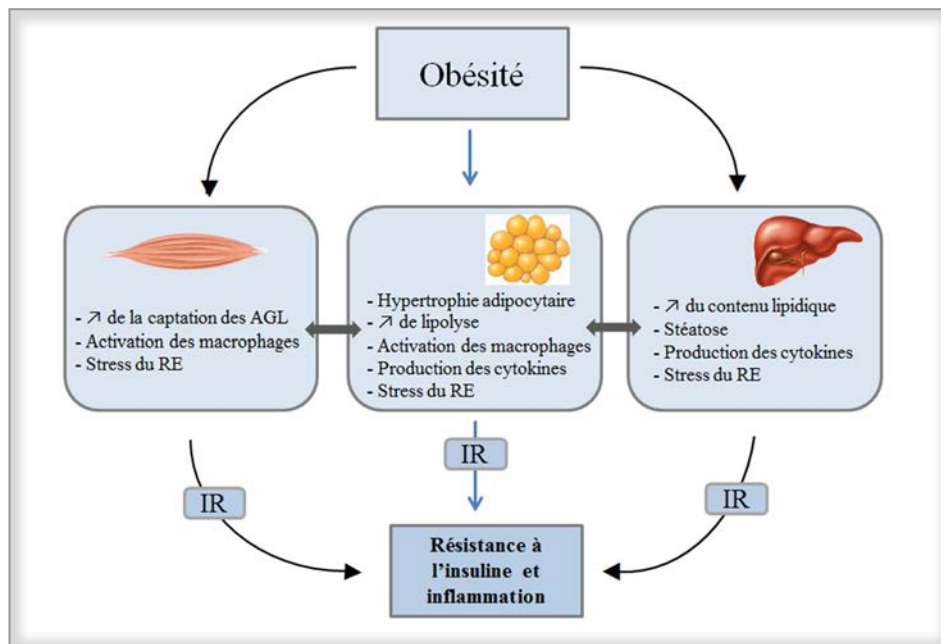


Figure 1 : Obésité, développement de l'inflammation et de l'insulino-résistance dans le foie, le tissu adipeux et les muscles (de Luca and Olefsky 2008).

1.1.2. NF- κ B et inflammation

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle important dans le déroulement du processus inflammatoire. Il fait partie de la famille Rel/NF- κ B qui constitue un système clé dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes cellulaires. Il a été décrit pour la première fois par Sen et Baltimore en 1986 et identifié comme un facteur trans-activateur des gènes des chaînes légères κ des immunoglobulines dans les lymphocytes B matures (Sen and Baltimore 1986). En revanche, plus récemment, il a été démontré que NF- κ B, en plus de son rôle dans les mécanismes physiologiques, est impliqué dans la genèse des états inflammatoires, notamment dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales comme la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (Li, Yu et al. 2005; Sun and Zhang 2007) et dans l'évolution des pathologies comme le diabète de type II (Chen 2005), l'obésité (Shoelson, Herrero et al. 2007; de Luca and

Olefsky 2008), le vieillissement (Tilstra, Clauson et al. 2011), l'athérosclérose et le cancer (Vidal-Vanaclocha 2009). Plusieurs stimuli sont impliqués dans l'activation de la voie de NF- κ B tels que les cytokines inflammatoires (TNF α et IL-1), les ligands des récepteurs «toll-like» comme les lipopolysaccharides (LPS), les irradiations aux rayonnements UV, les infections bactériennes et virales, les facteurs de croissance ainsi que le stress oxydatif (Viatour, Merville et al. 2005) (**Figure 2**).

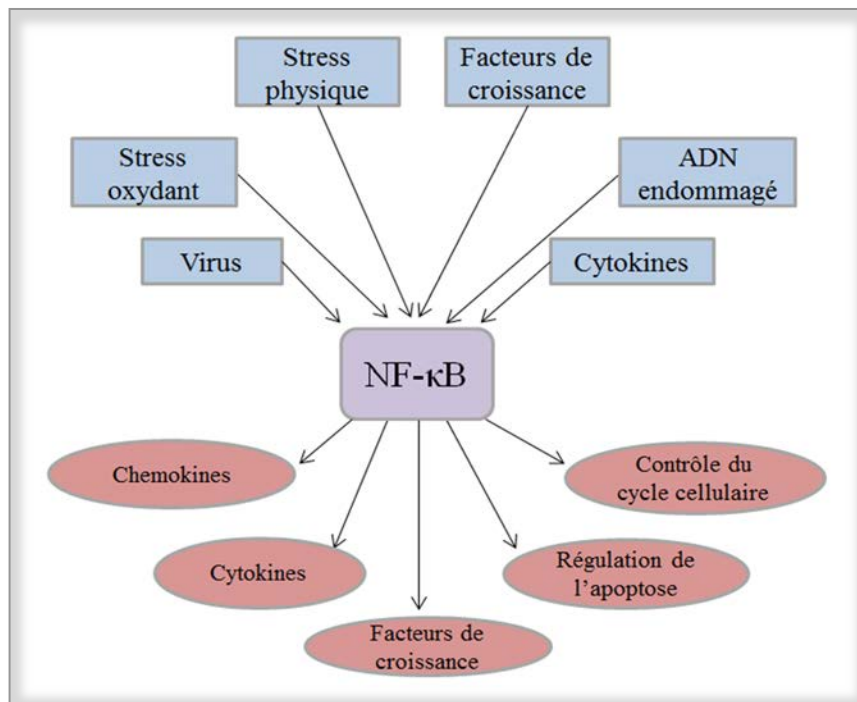


Figure 2 : NF- κ B est un centre régulateur en réponse au stress cellulaire (Tilstra, Clauson et al. 2011)

1.1.3. Voie de signalisation de NF- κ B

Le facteur nucléaire NF- κ B fait partie d'une famille composée de 5 protéines capables de se fixer sur l'ADN et qui régulent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans divers processus physiologiques tels que l'immunité, l'inflammation, l'apoptose, la prolifération cellulaire ainsi que les réponses au stress cellulaire et l'oncogénèse (Sarkar, Li et al. 2008). Il ne nécessite pas de synthèse protéique pour devenir actif, mais seulement la phosphorylation et la dégradation d'éléments inhibiteurs qui permettent la migration rapide des unités actives du cytoplasme vers le noyau. En effet, le complexe cytoplasmique NF- κ B est un hétérodimère

comprenant trois sous-unités : p50 (NF- κ B 1) qui favorise la fixation du dimère sur l'ADN, p65 (relA) qui possède l'essentiel de l'activité transcriptionnelle et I κ B α qui masque les signaux de localisation nucléaire de p50 et p65 et maintient ce complexe sous forme inactive en empêchant sa migration nucléaire. Les protéines inhibitrices de la famille I κ B sont : I κ B β , I κ B γ , I κ BR, Bc13. L'activation de NF- κ B est réalisée par le complexe I κ B kinase (IKK) qui est composé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une protéine régulatrice IKK γ /NEMO. Lorsque IKK est activé par certains agents (cytokines, UV...), il phosphoryle I κ B au niveau de sérines placées en position N-terminale et induit sa dégradation par le protéasome 26S, ce qui aboutit à la libération et à la migration des dimères p50-p65 vers le noyau où ils activent la transcription de nombreux gènes NF- κ B dépendants (Traenckner, Pahl et al. 1995; Moynagh 2005) .

Ainsi, les acteurs de l'inflammation peuvent avoir des effets délétères sur de nombreuses cibles cellulaires conduisant ensuite au déclenchement des maladies métaboliques. Cependant, le stress oxydant est également largement accepté comme un composant critique impliqué dans le développement de ces maladies métaboliques.

I.2. Le stress oxydant dans les maladies métaboliques

Le stress oxydant correspond à un état de déséquilibre de la balance redox dans les systèmes biologiques. Ce déséquilibre peut être dû à une surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS), à une diminution des défenses anti-oxydantes ou à une association de ces deux phénomènes (Sies 1991). De nombreuses études ont mis en évidence l'implication du stress oxydant dans de nombreuses pathologies notamment dans le diabète de type II (Wiernsperger 2003; Maiese, Chong et al. 2007), l'obésité (Vincent, Innes et al. 2007), les maladies neurodégénératives (Melo, Monteiro et al. 2011), l'athérosclérose (Heistad, Wakisaka et al. 2009) et le vieillissement (Romano, Serviddio et al. 2010). Une fois formées, les ROS peuvent induire des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques (enzymes, protéines, ADN, lipides, glucose). Toutefois, ces mêmes molécules jouent aussi un rôle physiologique important (défense antibactérienne, régulation de gènes, mécanisme de l'apoptose).

1.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les radicaux libres sont des molécules chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Ce sont des molécules très réactives, instables qui ont une durée de vie extrêmement courte (10^{-9} - 10^{-6} s) puisqu'elles réagissent rapidement avec les autres molécules qui sont proches de leur lieu de production. Les composants cellulaires tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont des cibles privilégiées des attaques radicalaires.

Les ROS sont une famille de molécules comprenant les espèces radicalaires comme l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$), l'hydroxyle (OH°), le monoxyde d'azote (NO°), et des espèces non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , l'oxygène singulet (1O_2) et le peroxydinitrite (ONOO).

Le superoxyde et l'hydroxyle sont très instables. A l'inverse, H_2O_2 diffuse librement et a une durée de vie plus longue. Les radicaux libres dérivant de l'oxygène représentent la classe la plus importante d'espèces radicalaires générées dans nos systèmes vivants (Miller, Buettner et al. 1990). En cas d'excès de production de ROS, des dommages oxydatifs peuvent être générés se traduisant par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN (Cooke, Evans et al. 2003), des protéines (Davies 2004) ou encore la peroxydation des lipides (Horton and Fairhurst 1987; Niki 2009).

La formation des radicaux libres est une conséquence normale du métabolisme aérobie. Les ROS peuvent être produites suite à des stimuli exogènes comme les rayonnements (rayons X et lumière UV), les polluants de l'air (NO_2) ou encore l'ozone. Elles sont également produites en réponse à des stimuli endogènes comme c'est le cas des chaînes respiratoires mitochondriales qui sont le siège des réactions impliquant O_2 et du système réducteur de transfert d'électrons dans les cellules aérobie (Balaban, Nemoto et al. 2005). Il existe également d'autres facteurs qui peuvent conduire à la production de ROS tels que l'exercice physique intense, certaines activités enzymatiques notamment (i) les NADPH oxydases produits par les cellules phagocytaires incluant les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles activées suite à une inflammation et (ii) les cytochromes P450 produits dans les peroxysomes et dans le réticulum endoplasmique au cours de la détoxification des xénobiotiques. De plus, les cellules inflammatoires et immunitaires en produisant des cytokines comme le $TNF\alpha$ sont capables de générer des ROS au niveau des mitochondries de leurs cellules cibles.

1.2.2. Les défenses antioxydantes

Afin de contrecarrer les effets délétères des ROS, l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense intracellulaire ainsi que d'un large choix de micronutriments antioxydants fournis par l'alimentation. Ainsi, le système antioxydant fait intervenir des molécules anti-oxydantes et des enzymes spécifiques comme les vitamines C, E, les caroténoïdes, les ubiquinones, les flavonoïdes, le glutathion et l'acide lipoïque. Les principales enzymes antioxydantes sont les superoxydes dismutases (SOD) (Brawn and Fridovich 1980), la catalase (CAT) (Kirkman, Rolfo et al. 1999) et les glutathion peroxydases (GPx) (Arthur 2000).

a- Les enzymes antioxydantes

(i) Les superoxydes dismutases (SOD) : ces enzymes permettent de neutraliser 80% des ions superoxydes générés par les mitochondries en peroxydes d'hydrogène et d'oxygène par une réaction intracellulaire de dismutation.

(ii) La catalase (CAT)

Cette enzyme est principalement localisée dans les peroxysomes et les globules rouges. Elle réduit le peroxyde d'hydrogène en libérant de l'eau et de l'oxygène. Son rôle devient plus important en présence d'ions ferreux.

(iii) Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx réduit les radicaux libres oxydés ou les hydroperoxydes en oxydant le glutathion réduit (GSH) en glutathion (GSSG) (Arthur 2000). Son fonctionnement exige un taux de sélénium (Se) optimal, car c'est un co-facteur indispensable. Enzyme puissante, elle utilise le GSH produit par les glutathions réductases (**Figure 3**). Son taux diminue (i) en cas d'insuffisance en Se, car elle est formée de 4 sous-unités identiques contenant chacune un atome de Se sous forme de sélénocystéine, et (ii) en cas de stress oxydant ayant épuisé les défenses.

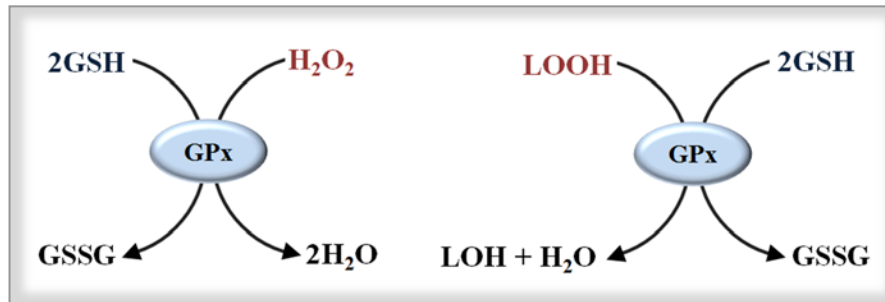


Figure 3 : Mode d'action de la GPx. LOOH : hydroperoxyde; LOH : composé lipidique réduit.

Il existe 4 types de GPx:

- La GPx intracellulaire cytosolique (cGPx) ou GPx-1, qui est présente surtout dans le cytosol et dans les mitochondries.
- La GPx gastro-intestinale (GI-GPx) ou GPx-2 qui est exclusivement exprimée dans le système GI et qui pourrait jouer le rôle de barrière contre l'absorption des hydroperoxydes provenant des aliments oxydés.
- La GPx plasmatique (p-GPx) ou GPx-3, qui est libérée dans le plasma en majeure partie grâce au le foie.
- La GPx phospholipide hydroperoxyde intracellulaire ou GPx-4, elle est capable de réduire les hydroperoxydes de phospholipides. Elle est exprimée dans les mitochondries, dans les noyaux et les membranes.

Ces quatre formes sont toutes retrouvées dans le système gastro-intestinal (GI).

b- Les molécules antioxydantes

(i) **Glutathion** : cette molécule est formée de 3 acides aminés (gamma - glutamylcystéinyglycine), contenant un groupement thiol capable de piéger les radicaux libres (**Figure 4**) (Li, Wei et al. 2004).

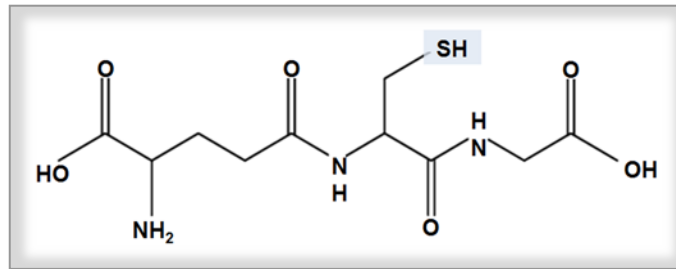


Figure 4 : Structure de γ -glutamylcysteinylglycine (GSH).

Dans les cellules animales, le glutathion est le thiol le plus répandu et agit comme co facteur de plusieurs enzymes. Il existe sous forme oxydée (GSSG) ou sous forme réduite (GSH). Le rapport GSH/GSSG est généralement utilisé comme un marqueur du stress oxydant cellulaire car plus la production des ROS est importante, plus le GSH réduit est consommé et le glutathion oxydé est élevé (Ji, Fu et al. 1992). Il est à noter que le glutathion peut intervenir dans différentes réactions qui constituent la base de l'implication des GSH dans la physiologie et la physiopathologie des cellules vivantes :

- Réaction avec les ROS
- Réaction avec les électrophiles : le GSH, grâce à la fonction thiol de sa cystéine, peut réagir avec des électrophiles comme les aldéhydes α , β insaturés (qui dérivent de la peroxydation lipidique des acides gras) pour former des composés conjugués non toxiques.
- Réaction avec les molécules antioxydantes : le GSH fait l'objet d'interactions synergiques avec des molécules du système de protection telles que la vitamine C ou la vitamine E (**Figure 5**).

(ii) Vitamines E ou tocophérols : ce sont des antioxydants liposolubles. Il existe 4 isomères de tocophérols : α , β , γ , δ , qui diffèrent seulement par le nombre de groupements méthyles présents sur le noyau chromane. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols, elle permet de neutraliser les radicaux libres, devenant elle-même un radical non toxique. La régénération de tocophérol est ensuite assurée par la vitamine C. Le rôle principal de l' α -tocophérol est d'inhiber l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, en cédant son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO^\bullet .

(iii) **Vitamine C ou acide ascorbique** : la vitamine C est une molécule hydrosoluble, non synthétisée par l'organisme, elle protège les protéines et comme mentionnée précédemment, intervient dans la régénération de l' α -tocophérol. Au cours de la régénération de l' α -tocophérol, la vitamine C s'oxyde en déhydroascorbate qui peut être reconvertir en sa forme réduite par l'intermédiaire de GSH (Winkler, Orselli et al. 1994).

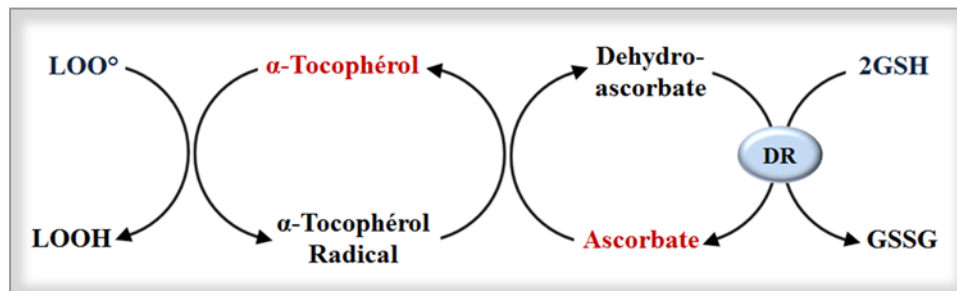


Figure 5 : Rôle de GSH dans la régénération des vitamines E et C. DR : Déhydroascorbate réductase.

(iv) **Vitamine A** : elle est apportée également par l'alimentation, elle protège les structures cellulaires contre l'attaque des radicaux libres.

Ainsi, ces antioxydants, si présents sur les sites de formation des ROS, permettraient de réduire les risques métaboliques en limitant leur production. Une production excessive de ces espèces représente un paramètre puissant dans l'amplification du stress oxydant et potentiellement dans l'induction du stress du réticulum endoplasmique ; une nouvelle cible des recherches dans le domaine des maladies métaboliques.

I.3. Stress du réticulum endoplasmique et maladies métaboliques

Le réticulum endoplasmique (RE) est le principal site de synthèse, du repliement et de maturation des protéines sécrétées et transmembranaires. Le RE est également le site de stockage de calcium Ca^{2+} et de synthèse des lipides. Il est essentiel à la survie cellulaire et toute perturbation dans son fonctionnement comme la formation et l'accumulation de protéines mal repliées conduit à une activation de réponse UPR (**Unfolded Protein Response**).

1.3.1. La réponse UPR

Cette voie de signalisation intracellulaire intégrée répond au stress du RE *via* une augmentation de l'expression des gènes des protéines chaperonnes localisées dans le RE comme la glucose regulated protein 78 (GRP78/Bip) et *via* une inhibition de la synthèse protéique (Cox, Chapman et al. 1997). La voie UPR fonctionne grâce aux 3 protéines senseurs exprimées à la surface du RE : les protéines kinases PERK (PKR-like ER Kinase), IRE1 (inositol requiring enzyme 1) et le facteur de transcription ATF6 (activation transcription factor 6). En l'absence de stress cellulaire, ces protéines transmembranaires sont maintenues inactives par leur association avec la protéine chaperonne GRP78/Bip. En cas de stress, la protéine GRP78/Bip se dissocie de ces 3 protéines kinases aboutissant à leur activation. Une fois activée, PERK phosphoryle et inhibe le facteur de croissance eIF2 α impliqué dans la traduction protéique, freinant ainsi la synthèse protéique globale (Ozcan, Cao et al. 2004). Durant le stress, ATF6 se dissocie de GRP78/Bip et migre vers l'appareil de Golgi où il subit un double clivage protéolytique pour libérer la fraction cytoplasmique. Cette protéine tronquée est ensuite relocalisée au niveau du noyau pour déclencher la transcription des gènes codant pour les protéines chaperonnes du RE telles que Bip, *glucose regulated protein 94* (Grp 94), ainsi que le facteur de transcription *X box-binding protein 1* (XBP1). IRE1 constitue la 3^{ème} protéine de la voie UPR, elle possède une activité endoribonucléase qui permet l'épissage alternatif du transcrit codant le facteur de transcription XBP1, ce qui permet sa traduction. Cependant, une dysfonction dans la réponse UPR ou un stress prolongé du RE peut conduire à l'apoptose cellulaire en activant certains gènes codant pour les protéines pro-apoptotiques telles que C/EBP protéine homologue (CHOP) qui est un facteur de transcription régulant plusieurs gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose (**Figure 6**). Dans les conditions normales, les cellules sont caractérisées par une faible expression ubiquitaire de la protéine CHOP. Lors d'un stress du RE, les trois facteurs de transcription, activés durant la réponse UPR, induisent la transcription des gènes codants pour CHOP et GRP78 (Rath and Haller 2011).

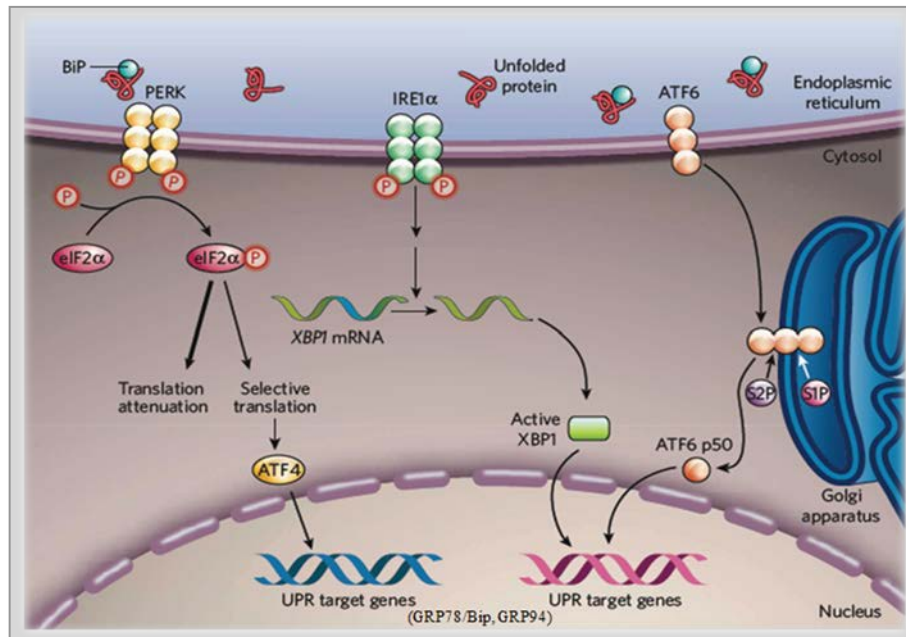


Figure 6 : Réponse UPR au stress du réticulum endoplasmique (Zhang and Kaufman 2008).

1.3.2. Stress du RE et maladies métaboliques

De nombreuses études ont montré que la voie UPR joue un rôle important dans l'apparition des maladies métaboliques telles que l'obésité, l'insulino-résistance, le diabète de type II et la stéatose hépatique (Ozcan, Cao et al. 2004; Hotamisligil 2007; Hummasti and Hotamisligil 2010). En effet, dans le tissu adipeux de sujets obèses et insulino-résistants, il a été montré une expression augmentée des médiateurs de la voie UPR (Boden, Duan et al. 2008). L'obésité induit également un stress du RE dans le foie et une insulino-résistance due à la phosphorylation d'IRS-1 par l'activation de l'IRE1 α et JNK (Ozcan et al 2004). En revanche, il a été montré que le stress du RE pouvait contribuer à l'induction de la voie de lipogenèse en activant directement le facteur de transcription lipogénique SREBP-1c (sterol Regulatory Element Binding Protein) chez les rongeurs obèses et insulino-résistants déclenchant ainsi une stéatose hépatique (Kammoun, Hainault et al. 2009).

Il a été montré récemment que le stress du RE et l'inflammation semblent être liés par la production des ROS et la perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Dans des conditions de stress du RE, la correction des protéines mal repliées, phénomène dépendant du

calcium, par les médiateurs de UPR peut générer des ROS qui sont dus (i) à la forte libération de Ca^{2+} du RE vers le cytosol pour être utilisé lors de la signalisation cellulaire (Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008) (ii) et à la protéine disulfure isomérase (PDI) qui est impliquée dans la réduction et le réarrangement de ponts disulfures incorrects. Lors du processus de réparation des protéines endommagées, cette protéine est réduite ce qui nécessite l'intervention d'une autre protéine ERO1 (Endoplasmic Reticulum Oxidoreduction 1) qui permet sa ré-oxydation, transfère les électrons directement à l'oxygène et produit ainsi des ROS (Uehara, Nakamura et al. 2006). De plus, une accumulation des protéines endommagées dans le RE peut entraîner une activation des médiateurs de UPR qui à leur tour activent le facteur de transcription pro-inflammatoire NF- κ B *via* phosphorylation des protéines kinases telles que JNK, MAPK et Akt et *via* la production des ROS (**Figure 7**) (Jiang, Wek et al. 2003; Zhang and Kaufman 2008; Kitamura 2011).

Il est important de noter que le stress du RE lié à l'inflammation peut être impliqué dans le développement de nombreuses pathologies telles que les maladies intestinales inflammatoires, les maladies cardiovasculaires et l'athérosclérose (Zhou, Lhotak et al. 2005; McGuckin, Eri et al. 2010; Kaser, Flak et al. 2011).

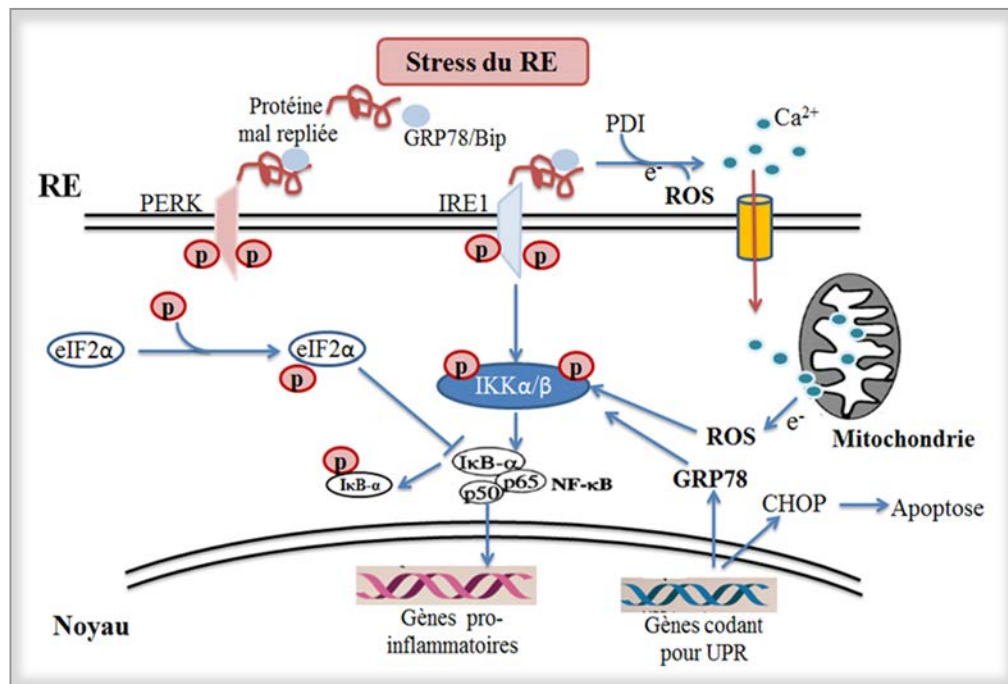


Figure 7 : Un modèle proposé pour l'implication du stress du RE dans l'activation de NF- κ B et la production de ROS. En réponse au stress du RE, PERK phosphoryle et inhibe le facteur de traduction *eIF2 α* menant à une répression globale de la synthèse protéique. *I κ B*, caractérisé par une demi-vie plus courte que celle de NF- κ B, va libérer NF- κ B. De plus, IRE1 autophosphorylée et GRP78 surexprimée peuvent interagir avec le complexe IKK qui à son tour phosphoryle et dégrade *I κ B*. Les ROS formés par l'action de PDI et au cours du passage de Ca^{2+} dans les mitochondries peuvent également activer le complexe IKK.

Le stress du RE déclenché par le système de réponse aux protéines non correctement repliées UPR est également un inducteur important de l'autophagie (Kroemer, Marino et al. 2010). L'autophagie est un état cellulaire programmé durant lequel la cellule digère et dégrade ses organelles et les protéines endommagées en acides aminés, acides nucléiques et acides gras par des hydrolases PH dépendantes. Les produits issus de la dégradation sont ensuite réutilisés par les cellules (Kroemer and Jaattela 2005). Ce processus peut être stimulé par de nombreuses formes de stress cellulaire incluant la carence en nutriments et en facteurs de croissance, l'hypoxie, les ROS, l'ADN endommagé et les pathogènes intracellulaires. Le but de l'autophagie est d'éliminer pathogènes, macromolécules et structures altérées (Klionsky and Emr 2000). Il est important de noter qu'une altération de l'autophagie est associée à la mort cellulaire et contribue de manière significative aux dysfonctions métaboliques (Ebato, Uchida et al. 2008; Yang, Li et al. 2010).

En conclusion, les maladies métaboliques se caractérisent par un large panel de dérégulations cellulaires fortement interdépendantes comme l'inflammation, le stress oxydant et le stress du RE. A présent, la corrélation entre le développement de ces maladies métaboliques et la quantité et la qualité des lipides de notre régime alimentaire occidental est bien établie (Kremmyda, Tvrzicka et al. 2011; Ortega, Varela et al. 2012).

II. Les lipides alimentaires et leur digestion

Dans nos sociétés occidentales, les lipides font une partie intégrante de notre alimentation quotidienne. Selon les recommandations nutritionnelles récentes, les lipides alimentaires devraient représenter 35 à 40 % de l'apport énergétique total quotidien (AFSSA 2010), soit environ 20 % en masse de l'ensemble des macronutriments (protéines + glucides + lipides). Les quantités recommandées ont pour but d'apporter suffisamment de lipides pour que ceux-ci puissent exercer leurs effets utiles et bénéfiques sur le fonctionnement de l'organisme et dans le même temps de limiter leur apport au raisonnable car comme pour tout nutriment, l'excès de lipides serait néfaste pour la santé.

Le terme «lipides» regroupe les acides gras, leurs dérivés et les substances qui leur sont apparentées d'un point de vue de leur biosynthèse ou de leur fonctionnalité. Ce sont les constituants essentiels des membranes biologiques de toute cellule vivante. Consommer des lipides permet d'apporter de l'énergie, des vitamines et des acides gras essentiels. Plus de 90% des lipides que nous ingérons quotidiennement sont sous forme de triacylglycérols (TG).

II.1. Structures moléculaires

II.1.1. Structure moléculaire des acides gras

Les AG sont formés d'une chaîne hydrocarbonée avec un groupement méthyl (CH_3) à une extrémité et un groupement acide (COOH) à l'autre. Ils sont classés selon :

- 1- La longueur de la chaîne carbonée qui possède dans la majorité des cas un nombre pair de carbone (C). Les AG de 16 à 22 C sont les plus représentés parmi les lipides alimentaires.

- 2- Le nombre de doubles liaisons allant de 0 à 6 doubles liaisons : les AG saturés ne possèdent aucune double liaison. Les AG mono-insaturés possèdent une seule double liaison et les AG polyinsaturés présentent plusieurs doubles liaisons séparées par une unité méthylène. Chaque double liaison est représentée par le symbole (n) suivi d'un chiffre indiquant sa position par rapport à l'extrémité du groupement méthyl de la chaîne. (**Tableau 1**).
- 3- Le positionnement des atomes d'hydrogène autour des doubles liaisons : il existe la forme naturelle majeur «cis» où les deux atomes d'hydrogène adjacents sont du même côté, et la forme «trans» où les atomes d'hydrogène sont du côté opposé de la double liaison. Cette dernière forme peut être produite par hydrogénation catalytique et présente une rigidité plus élevée du fait que la chaîne d'AG soit rectiligne.

Catégorie	Formule	Nom commun	Abréviation
Saturés	16:0	Acide palmitique	
	18:0	Acide stéarique	
	20:0	Acide arachidique	
Mono-insaturés	16:1n-7	Acide 9-cis-hexadécénoïque	
	16:1n-9	Acide palmitoléique	
	18:1n-7	Acide 11-cis-octadécénoïque	
	18:1n-9	Acide oléique	AO
Polyinsaturés	18:2n-6	Acide linoléique	LA
	18:3n-3	Acide α -linoléique	ALA
	20:4n-6	Acide arachidonique	AA
	20:5n-3	Acide eicosapentaénoïque	EPA
	22:6n-3	Acide docosahexaénoïque	DHA

Tableau 1 : Classification et nomenclature des acides gras les plus courants.

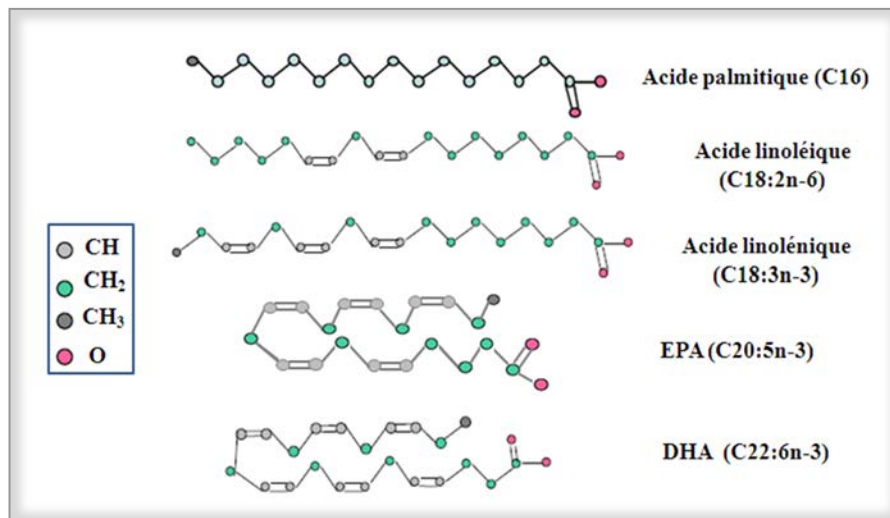


Figure 8 : Structure chimique de quelques acides gras (adapté de Genot & Michalski 2010).

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) les plus importants sont l'acide linoléique et l'acide α -linoléique (**Figure 8**). Ces deux AG sont considérés comme AG essentiels. En effet, l'homme est incapable de les synthétiser du fait de l'absence des $\Delta 12$ désaturase et $\Delta 15$ désaturase dans sa machinerie enzymatique. Ils doivent donc être apportés par l'alimentation.

II.1.2. Structure des molécules vectrices des acides gras

Les acides gras non estérifiés ou libres ne sont présents qu'en faible proportion dans les lipides alimentaires (quelques pour cent au maximum). La grande majorité des AG alimentaires sont sous forme estérifiée dans les triglycérides qui sont des lipides neutres (TG ; huiles et graisses alimentaires) ou dans les phospholipides qui sont des lipides polaires (PL).

Les triglycérides constituent la majeure partie des lipides alimentaires (~97%) ainsi que des lipides stockés dans le tissu adipeux. Ils sont composés de trois molécules d'acides gras estérifiés à une molécule de glycérol. Une autre classe de lipides importante pour ses fonctionnalités technologiques et nutritionnelles est celle des phospholipides (glycérophospholipides, couramment appelés lécithines en technologie) dans lesquels la fonction alcool du glycérol en position *sn*-3 est estérifiée par un groupement phosphoryle lui-même substitué par un

groupement polaire, chargé (phosphatidyl sérine, phosphatidyl inositol,...) ou non (phosphatidyl choline, phosphatidyl éthanolamine). Sur les deux autres fonctions alcool sont fixés soit une, on a alors un lyso-phospholipide, soit deux chaînes grasses. La chaîne en position *sn-1* peut être fixée par une liaison ester, éther ou vinyl-éther, ce qui est le cas des plasmalogènes présents dans les produits carnés. Dans les phospholipides naturels, généralement au moins une chaîne grasse est insaturée, le plus souvent en position *sn-2* (**Figure 9**).

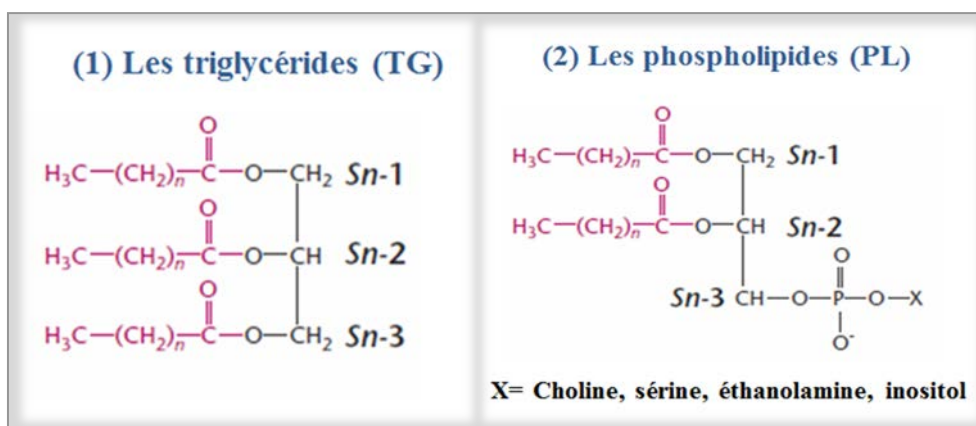


Figure 9 : Structure chimique des TG et PL.

Ainsi, dans l'étude de la biodisponibilité et des effets métaboliques de différents types d'acides gras, il convient également de tenir compte du rôle possible de leur molécule vectrice, PL ou TG.

II.2. Digestion des lipides

La digestion est définie par une série de réactions d'hydrolyse qui vont permettre de dégrader les lipides d'origine alimentaire en molécules lipidiques absorbables au niveau de la barrière intestinale. Ces lipides, pour qu'ils puissent traverser la paroi intestinale et entrer dans la cellule épithéliale doivent subir une hydrolyse gastrique puis duodénale. Etant donné que l'essentiel des apports lipidiques alimentaires est constitué des triglycérides, la partie suivante traitera principalement de la digestion des lipides sous forme de TG.

La digestion des lipides est amorcée dans l'estomac où la lipase gastrique, enzyme sécrétée par les cellules principales de l'estomac chez l'Homme, hydrolyse préférentiellement les liaisons esters en position en *sn-3* d'une proportion non négligeable de TG, pour libérer des AGL et des diacylglycérols (DG) (Moreau, Laugier et al. 1988). Cette enzyme agit à pH acide qui varie entre 4 et 6. Elle intervient dans l'hydrolyse de 5 à 37 % des triglycérides alimentaires (Carriere, Barrowman et al. 1993).

Les AGL contenus dans l'estomac induisent la libération de l'hormone cholécystokinine (CCK) de la paroi intestinale, déclenchant ainsi des contractions dans la vésicule biliaire. Les acides biliaires et les enzymes pancréatiques, notamment la lipase pancréatique sont alors excrétés dans la partie proximale de l'intestin grêle (Hildebrand, Beglinger et al. 1990). Les TG résiduels et les DG issus de l'hydrolyse gastrique sont alors hydrolysés en position *sn-1* et *sn-3* en AG et 2-monoacylglycérols (2-MG) dans l'intestin grêle proximal par le complexe lipase-colipase pancréatique (Armand, Borel et al. 1994). La lipase pancréatique fonctionne à des pH compris entre 6.5 et 9 et nécessite l'intervention d'une colipase qui permet l'adsorption de la lipase pancréatique à l'interface lipides-eau. Elle est inhibée par la présence des sels biliaires (seulement en absence de colipase) et par les phospholipides. L'hydrolyse duodénale contribue ainsi à la digestion des triglycérides alimentaires à hauteur de 40 à 73 % (Carriere, Barrowman et al. 1993).

Les phospholipides d'origine alimentaire et hépatique sont dégradés par la phospholipase A2 qui est sécrétée par le pancréas. Elle hydrolyse les phospholipides membranaires en position *sn-2* et libère un AG et un lysophospholipide.

Après l'hydrolyse des lipides, les produits de dégradation sont ensuite associés aux sels biliaires, aux PL et aux stérols pour former des micelles mixtes. Les micelles ainsi formées gagnent la bordure en brosse des cellules intestinales puis sont absorbées dans l'entérocyte (Armand, Borel et al. 1994).

II.3. Physiologie de l'intestin grêle

L'intestin grêle est un organe hétérogène, reliant l'estomac au gros intestin. Sa longueur chez l'homme adulte est d'environ 6 m. Cette partie est décomposé en trois segments successifs distincts qui présentent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles différentes: le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le duodénum est un segment court et fixe, il reçoit les sels biliaires et les enzymes pancréatiques. C'est au sein de cette partie que se déroule l'étape la plus

importante de la digestion et l'hydrolyse des lipides alimentaires. Le jéjunum représente le site préférentiel de l'absorption lipidique et exprime de nombreuses protéines impliquées dans le déroulement de ce processus. Quant à l'iléon, il est le site majeur de réabsorption des sels biliaires. Au niveau de ce segment, se déroule également l'absorption de certaines vitamines (notamment B12), électrolytes et micronutriments. Ces 2 derniers sites sont flottants et mobiles. L'épithélium intestinal est formé de 4 types cellulaires : les entérocytes, les cellules endocrines, les cellules à mucus et les cellules de Paneth (**Figure 10**).

Les entérocytes : ils représentent plus de 80% des cellules totales. Ces cellules permettent grâce à leur polarité le transport des nutriments (lipides, acides aminés, glucose) de la lumière intestinale vers le sang. Les entérocytes sont liés entre eux par différents types de jonctions : jonctions serrées, jonctions adhérentes et desmosomes assurant ainsi la fonction d'une barrière mécanique imperméable. L'entérocyte est caractérisé par la présence, au pôle apical, d'une bordure en brosse composée de microvillosités denses et ordonnées qui augmentent davantage la surface d'absorption des nutriments. Au pôle basolatéral des entérocytes, se trouvent les protéines impliquées dans les mécanismes de sécrétion des nutriments absorbés dans la circulation sanguine.

Les cellules endocrines : elles représentent une population très hétérogène. Leur caractéristique commune est de posséder des granules de sécrétion au niveau de leur partie basal. Elles sécrètent des neuropeptides impliqués dans le contrôle des sécrétions gastriques, pancréatiques et intestinales ainsi que dans la motricité du système digestif (Lee and Kaestner 2004).

Les cellules à mucus «cellules caliciformes» : elles sont dispersées entre les entérocytes. Elles produisent du mucus qui s'accumule dans leur cytoplasme sous forme de granules jusqu'à la libération du contenu de ceux-ci à la surface de l'épithélium (Kraehenbuhl, Pringault et al. 1997). Ce mucus constitue alors une couche recouvrant toute la surface de l'épithélium. Il joue un rôle de lubrifiant pour le continu intestinal peut engluer des microorganismes ce qui permet de protéger l'épithélium.

Les cellules de Paneth : elles se trouvent dans la partie inférieure des cryptes. Ces cellules sont impliquées dans les mécanismes de défense cellulaire. Elles sécrètent du lysosyme, capable de digérer la paroi de certaines bactéries Gram positives (Erlandsen and Chase 1974), des défensines ou cryptidines (Ayabe, Satchell et al. 2000; Cunliffe, Rose et al. 2001) et des

phospholipases A2 (Nevalainen, Gronroos et al. 1995) . Une altération dans la fonction de ces cellules peut être impliquée dans la genèse des maladies inflammatoires intestinales du fait de leur impact potentiel sur le microbiote intestinal (Ouellette and Bevins 2001).

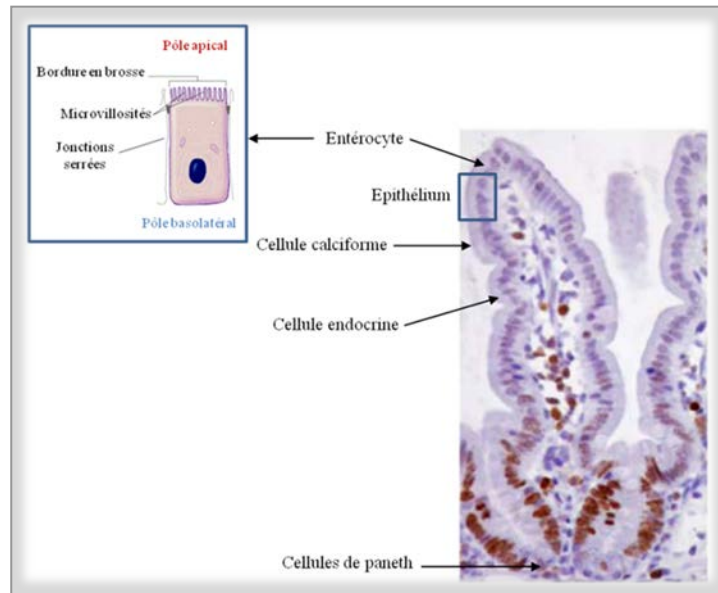


Figure 10 : Structure de l'unité fonctionnelle d'une cellule épithéliale (adapté de (Pinto and Clevers 2005)).

II.4. Absorption intestinale des lipides

Les produits d'hydrolyse des lipides (AG, monoacylglycérols, lysophospholipides...) inclus dans les micelles vont entrer dans le pôle apical des entérocytes afin de passer dans la lumière intestinale à la circulation lymphatique puis sanguine. L'absorption des lipides est un phénomène complexe en raison de leur hydrosolubilité très limitée et de la taille importante de ces molécules.

L'absorption intestinale des lipides est classiquement décomposée en trois étapes successives : (i) captage entérocytaire des lipides, (ii) métabolisme des lipides intra-entérocytaires et (iii) assemblage et sécrétion des chylomicrons.

II.4.1. Captage entérocytaire des lipides

Pour que les lipides contenus dans les micelles soient absorbés par la cellule intestinale, ils doivent être d'abord séparés des sels biliaires. Les entérocytes ont la particularité de posséder à la surface de leur bordure en brosse un microenvironnement particulier. Il s'agit d'une couche d'eau «non agitée», zone aqueuse ayant une vitesse de renouvellement plus lente par rapport aux autres compartiments intestinaux due à la présence de glycoprotéines hydrophiles. Ce microenvironnement dont l'épaisseur se situe entre 50 et 500 μm présente un pH acide (pH 5.3-6). Cette acidité est générée par des pompes à protons qui génèrent dans cette zone un gradient de pH, celui-ci permet la protonation des AG dans les micelles conduisant ainsi à la dissociation des micelles et à la libération des AG protonés à travers la membrane microvillositaire. Ces derniers sont capturés dans l'entérocyte. Cependant le mécanisme d'entrée des AG et des monoacylglycérols dans les entérocytes est encore sujet à débat. En effet, il semble que leur passage à travers de la membrane microvillositaire soit complétement par deux mécanismes de transport : la diffusion simple résultante du gradient de concentration créé par l'abondance de lipides dans la lumière intestinale et leur faible concentration dans le milieu cytosolique (Trotter, Ho et al. 1996) et le transport facilité qui implique des transporteurs membranaires pour transporter les AG à longue chaîne (Chaves, Elias et al. 2003).

Il existe trois protéines intestinales présentes à la membrane apicale entérocytaire et qui possèdent une haute affinité pour les lipides. Elles sont regroupées sous le terme générique de «lipid binding proteins».

- 1- ***FABPpm* ou «fatty acid binding protein» de la membrane plasmique** : c'est une protéine de 43 KDa, exprimée dans différents organes mais exclusivement dans l'intestin grêle au niveau apical et basolatéral des entérocytes (Stremmel, Lotz et al. 1985). Elle est impliquée dans le transport navette des AG à longue chaîne (AGLC) mais aussi des MG, des lyso-PL et de Cholestérol (Stremmel 1988).
- 2- ***FAT/CD36* ou «fatty acid transporter»** : c'est une glycoprotéine de 88KDa exprimée dans différents tissus caractérisés par un métabolisme lipidique important tels que le tissu adipeux, le muscle, le cœur et l'intestin grêle (Poirier, Niot et al. 1997). Au niveau intestinal, ce transporteur intervient dans l'absorption des AG dans l'entérocyte et leur sécrétion sous forme des chylomicrons (Poirier, Niot et al. 1997; Drover, Ajmal et al.

2005). Son expression est augmentée lors de la consommation de régimes gras ou en cas d'obésité ou de diabète de type II (Greenwalt, Scheck et al. 1995).

- 3- **FATP4** ou «*fatty acid transporter protein 4*» : Les « Fatty Acid Transport Proteins » (FATPs/solute carrier family 27) sont des protéines transmembranaires de 63 kDa, identifiées aux niveaux de différents tissus et plus particulièrement au niveau de l'intestin grêle. Actuellement, 5 formes ont été identifiées chez les souris et 9 chez l'homme (Schaffer and Lodish 1994). Au niveau intestinal, on trouve FATP4, une protéine de 71 kDa. C'est la seule FATP exprimée au niveau des microvillosités de la bordure en brosse des entérocytes. Elle est impliquée dans le captage des AG au niveau des entérocytes (Stahl, Hirsch et al. 1999).

II.4.2. Métabolisme intra-entérocytaire des lipides

Une fois dans l'entérocyte, les lipides sont transférés à des protéines cytosoliques de liaison des AG, soit les isoformes I-FABP (intestinale) (Westergaard and Dietschy 1976) et L-FABP (hépatique) (Stremmel, Strohmeyer et al. 1985) qui ont été identifiées simultanément et en abondance dans l'intestin grêle. Les 2 FABP permettent de transférer les AG de la membrane plasmique jusqu'au RE (Agellon, Toth et al. 2002). Les AG sont ensuite métabolisés en acyl coenzyme A (CoA) par les «long chain acyl-CoA synthetases» (ACS) puis en triglycérides ou en phospholipides sous l'action de l'enzyme diacylglycérol-acyltransférase (DGAT). La synthèse des TG peut s'effectuer selon 2 voies: celle des 2-monoacylglycérols ou celle de l' α -glycérophosphate (**Figure 11**). Durant les périodes postprandiales, la voie des 2-monoacylglycérols qui est spécifique de l'intestin est la plus active alors que pendant les périodes de jeûne ou inter-prandiales, la 2^{ème} voie qui se déroule également dans le foie, est majoritaire.

La voie des 2-monoacylglycérols permet l'acylation des monoacylglycérols en position *sn*-2 par l'action de l'enzyme monoacylglycérol acyltransférase (MGAT). Le monoacylglycérol en position *sn*-2 est alors acylé en diglycéride qui subit à son tour une acylation en TG par l'action de la diacylglycérol acyltransférase (DGAT). La voie de l' α -glycérophosphate quant à elle, recrute l'enzyme glycérophosphate acyltransférase (GPAT) pour former l'acide phosphatidique à partir de d'acyl-CoA. Sous l'action de l'enzyme phosphatidate phosphohydrolase, l'acide phosphorique est hydrolysé en 1,2-diacylglycérol qui est ensuite estérifié soit par la DGAT en TG soit par la phosphocholine diacylglycérol-acyltransférase en phospholipides.

Le cholestérol libre est estérifié par l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) en esters de cholestérol (CE)

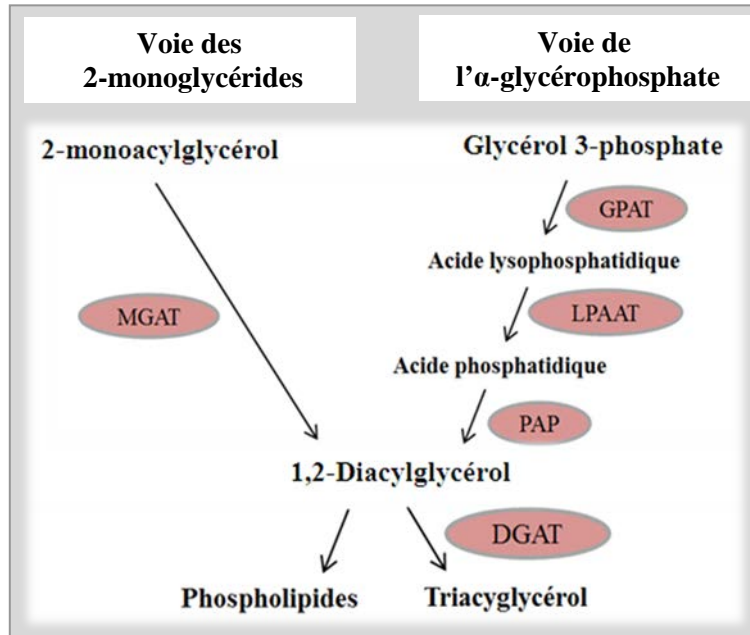


Figure 11 : Voies de ré-estérification des lipides au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Les abréviations utilisés : MGAT : monacylglycérol acyltransférase ; GPAT : glycérol 3-phosphate acyltransférase ; LPAAT : aide lysophosphatidique acyltransférase ; PAP : acide phosphatidique phosphatase.

Les TG néosynthétisés pénètrent ensuite dans le réticulum endoplasmique grâce au transporteur MTP (microsomal triglyceride transfert protein) où ils s'associent à l'apolipoprotéine A et à l'Apolipoprotéine B-48 (Apo B-48) pour former des préchylomicrons.

L'Apo B-48 est la forme tronquée de l'Apo B-100. Les deux protéines sont codées par le même gène «APOB». L'Apo B-48 est exprimée au niveau de l'intestin, elle intervient dans la formation des chylomicrons postprandiaux. L'Apo B-100 est plus exprimée dans le foie où elle est nécessaire à la production des VLDL dans le foie.

Dans l'intestin, l'ARNm Apo B-48 est le résultat d'une modification post-transcriptionnelle de l'ARNm ApoB. Il s'agit d'une désamination spécifique d'une cytosine en uracile (C-en-U) au niveau du nucléotide 6666 de l'ARNm Apo B produisant un codon stop prématuré et donc la synthèse de la protéine Apo B-48 qui présente 48% de la séquence de l'Apo B-100.

II.4.3. Assemblage et sécrétion des chylomicrons

Afin que les lipides puissent être libérés dans la circulation, ils doivent être incorporés dans les lipoprotéines qui sont les particules de transport dans le milieu aqueux. L'intestin a la capacité d'assembler et de sécréter différentes sortes de lipoprotéines mais plus particulièrement des chylomicrons qui sont les principaux véhicules des lipides alimentaires. La formation des chylomicrons débute au niveau du RE avec l'assemblage des préchylomicrons pendant la période postprandiale. Elle se fait sous le contrôle de l'Apo B-48 et de la protéine MTP. La MTP joue un rôle primordial dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en TG (chylomicrons et VLDL). En effet, elle permet la «lipidation» de l'apo B-48 afin de la protéger contre la dégradation de protéasome durant son transport vers le RE (Hussain, Kancha et al. 1996). De plus, une étude récente réalisée chez des souris dont le gène MTP a été invalidé, a montré une accumulation des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des entérocytes avec une diminution de sécrétion des chylomicrons associée à une diminution de 80% de sécrétion de l'Apo B-48 par l'entérocyte (Xie, Newberry et al. 2006).

La synthèse des chylomicrons contenant de l'Apo B-48 se déroule en 2 étapes : la première étape correspond à la synthèse de lipoprotéines primitives et la seconde étape correspond au développement du noyau et à la synthèse des lipoprotéines.

Au cours de la 1^{ère} étape, la MTP prend en charge les lipides comme les TG, les PL et les esters de cholestérol pour les transférer de la membrane du réticulum endoplasmique à l'Apo B-48, assemblant ainsi les lipoprotéines primitives.

Durant la 2^{ème} étape, des gouttelettes lipidiques riches en triglycérides et en ester de cholestérol se forment dans la lumière du RE indépendamment de la présence d'Apo B-48. Ces gouttelettes lipidiques fusionnent avec les lipoprotéines primitives aboutissant à la formation des pré-chylomicrons de petites ou de grandes tailles selon l'apport alimentaire lipidique qui vont gagner l'appareil de Golgi.

Une fois dans l'appareil de Golgi, les pré-chylomicrons sont maturés et transformés en chylomicrons. Ces derniers sont ensuite libérés au niveau de la partie basale de la cellule épithéliale et gagnent le chylifère central de la villosité intestinale. De là, ils sont transportés par la lymphe jusqu'au canal thoracique et aboutissent dans la circulation générale (**Figure 12**).

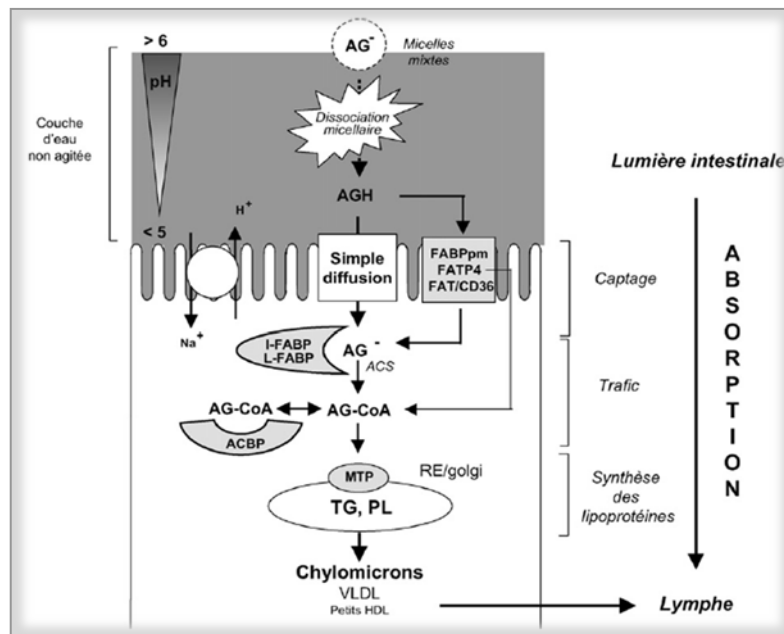


Figure 12 : Absorption intestinale des lipides. Dans la lumière intestinale, les AGH (acides gras protonés) sont captés par l'entérocyte par diffusion passive ou par l'intermédiaire des transporteurs membranaires. Dans l'entérocyte, ils sont ré-estérifiés au niveau du RE en TG sous le contrôle de la MTP et l'Apo B-48 pour former des pré-chylomicrons. Ces derniers subissent la maturation dans l'appareil de Golgi pour donner des chylomicrons. Les chylomicrons sont ensuite transportés vers la lymphe (adapté de (Petit, Niot et al. 2007)).

Les TG des chylomicrons subissent ensuite une hydrolyse par la «lipoprotéine lipase» ou LPL. Il est important de noter que la clairance des chylomicrons dépend de leur taille et de leur nombre. En effet, les chylomicrons de grande taille sont plus hydrolysés que ceux de petites tailles en raison de leur grande affinité avec la LPL (Xiang, Cianflone et al. 1999). Les AG libérés lors de la lipolyse sont utilisés comme source d'énergie par les tissus périphériques ou sont mis en réserve (**Figure 13**).

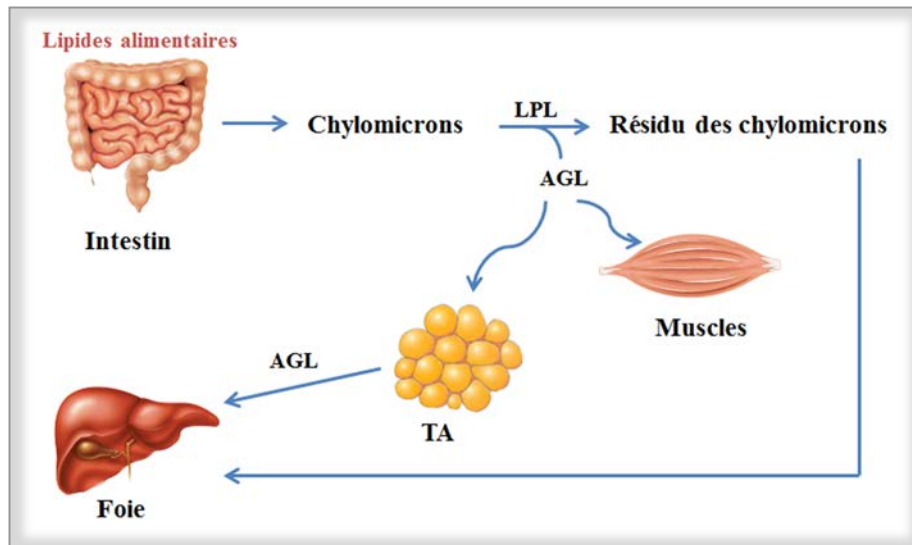


Figure 13 : Transport des lipides alimentaires après absorption intestinale vers le foie, les muscles et les tissus adipeux.

L'association entre la dérégulation de la lipogenèse et les maladies métaboliques est actuellement très étudiée. La dyslipidémie postprandiale, notamment la surproduction des lipoprotéines intestinales (Chylomicrons, VLDL) et de l'Apo B-48 intestinale, est de plus en plus reconnue comme un facteur sous-jacent dans la progression des maladies métaboliques (Phillips, Bennett et al. 2002; Xiao and Lewis 2012). Elle contribue également d'une façon significative à l'hypertriglycéridémie qui semble être un puissant facteur de risque des complications cardiovasculaires dans les maladies chroniques.

Des études récentes chez des sujets obèses et sur des modèles animaux obèses et insulino-résistants ont mis en évidence une relation entre la surproduction de chylomicrons contenant de l'Apo B-48 et l'altération de la voie de signalisation de l'insuline. En effet, il a été montré que l'insuline, hormone hypoglycémisante, réduit la sécrétion des chylomicrons dans les cellules intestinales de fœtus humains (Loirdighi, Menard et al. 1992). En revanche, des études réalisées sur des animaux insulino-résistants ont montré que l'insuline perd sa capacité à inhiber la sécrétion de l'Apo B-48 lorsque l'organisme est en état d'hyperinsulinémie postprandiale (Federico, Naples et al. 2006; Adeli and Lewis 2008). Ceci suggère que l'intestin n'est pas seulement un organe passif impliqué dans le métabolisme lipidique mais qu'il peut altérer le transport des lipides intestinaux et la production des chylomicrons en fonction de l'état de

l'organisme. Ces facteurs contribuent significativement à la dyslipidémie postprandiale qui semble jouer un rôle prépondérant dans l'apparition et l'aggravation des maladies métaboliques. Il est intéressant de noter que les régimes alimentaires riches en lipides jouent un rôle clé dans la régulation de la synthèse des chylomicrons contenant de l'Apo B-48. Des études *in vitro* sur les cellules intestinales Caco-2 ont montré que les micelles lipidiques stimulent la sécrétion des lipoprotéines contenant d'Apo B-48 (Chateau, Pauquai et al. 2005). Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo* chez des souris soumises à un régime hyperlipidique (Xie, Nassir et al. 2003).

II.5. Un modèle cellulaire d'étude: Caco-2/TC7

La lignée cellulaire Caco-2 est constituée d'une population hétérogène de cellules cancéreuses issues d'un adénocarcinome colorectal humain. Ce modèle est largement utilisé pour étudier les fonctions intestinales et notamment l'absorption des xénobiotiques. Les cellules Caco-2 présentent un fonctionnement proche de celui de l'intestin grêle de l'Homme surtout au niveau de l'absorption des nutriments (Lennernas 1997). Elles présentent, tout comme les entérocytes matures, une membrane apicale en bordure en brosse ainsi que des jonctions serrées lorsqu'elles sont différenciées.

Les cellules sont classiquement ensemencées sur un support poreux où elles forment une monocouche qui sert à délimiter le compartiment apical mimant la lumière intestinale *in vivo* et le compartiment basal qui mime le sang. Après confluence, ces cellules se différencient spontanément en cellules morphologiquement et biochimiquement proches des entérocytes humains. Elles sont maintenues sans sérum au niveau apical afin de permettre une polarisation à l'image des entérocytes humains (Jumarie and Malo 1991). Cette différenciation se réalise pendant environ 21 à 25 jours (**Figure 14**).

Les cellules Caco-2 expriment à leur surface de nombreuses protéines impliquées dans l'absorption et le transport de nutriments comparables à celles retrouvées dans les entérocytes humains différenciés. En effet, elles présentent des systèmes de transport de glucose dépendants et indépendants du Na⁺ : SGLT et GLUT (Blais, Bissonnette et al. 1987). Elles expriment aussi des systèmes de transport pour les peptides, les acides aminés (Inui, Yamamoto et al. 1992; Thwaites, McEwan et al. 1993), les acides biliaires et les protéines d'efflux. L'activité métabolique des cellules Caco-2 se rapproche également de celles de l'intestin car elles peuvent synthétiser et sécréter des lipoprotéines : en particulier, elles synthétisent des apolipoprotéines (Apo B-48...) et des chylomicrons (Delie and Rubas 1997). Elles peuvent exprimer des

peptidases, des enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase, glutathion réductase, catalase, superoxyde dismutase...) et des cytochromes P450. Il est à noter que l'activité de ces enzymes antioxydantes augmente après confluence (Bestwick and Milne 2001), d'où la capacité des cellules différenciées à lutter contre le stress oxydant. Par conséquent, les cellules Caco-2 constituent un modèle cellulaire fiable pour les études prédictives *in vitro* d'absorption ou de métabolisation intestinale.

Cependant, les cellules Caco-2 constituent une population hétérogène de cellules hautement dépendante des conditions de culture. En effet, elles peuvent présenter des phénotypes variables concernant l'expression de certaines enzymes (sucrase-isomaltase, phosphatase alcaline...) et des transporteurs membranaires (P-gp...) modifiant ainsi les propriétés absorbatives de ce modèle. Afin de limiter cette variabilité, des clones ont été isolés à partir de la lignée parentale des cellules Caco-2. Cette sélection a permis d'obtenir des lignées cellulaires homogènes possédant des propriétés bien précises et reproductibles (Caco-2/TC7, Caco-2/AQ, Caco-2/15...) (Sambuy, De Angelis et al. 2005).

Parmi ces lignées, le clone TC7 a été sélectionné à partir de la lignée parentale Caco-2 présentant un haut degré de différenciation. Les Caco-2/TC7 sont caractérisées par leur capacité de transporter : le mannitol par la voie paracellulaire, la testostérone par diffusion passive et l'acide taurocholique via les transporteurs d'acides biliaires (Chantret, Rodolosse et al. 1994). Une étude, visant à comparer les quatre clones cellulaires des Caco-2 a démontré que les Caco-2/TC7 constituent la population la plus homogène en comparaison des autres lignées. Ceci est dû à la présence de la monocouche fortement développée, et plus particulièrement à la présence des jonctions intercellulaires. De plus, il a été démontré que les cellules Caco-2/TC7 ont davantage la capacité d'absorber les lipides et de sécréter des lipoprotéines dans le milieu basolatéral en comparaison avec les autres clones de cellules Caco-2 (Salvini, Charbonnier et al. 2002).

Toutes ces caractéristiques morphologiques et biochimiques permettent de qualifier les Caco-2/TC-7 comme étant un clone hautement différencié constituant un modèle solide pour les études prédictives d'absorption et de métabolisation intestinale des lipides *in vitro*.

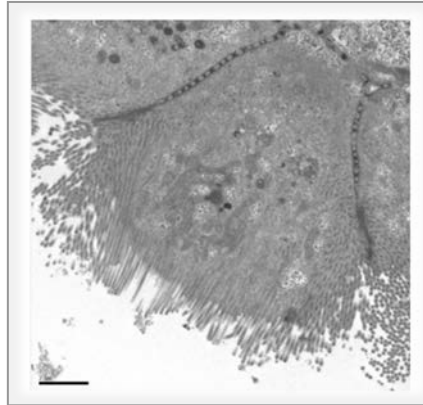


Figure 14 : Cellule Caco-2/TC7 observée sur une microscopie électronique.

III. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne : essentiels mais sensibles à l'oxydation

Les lipides sont des éléments essentiels de notre alimentation. Ils contribuent, après absorption intestinale au bon fonctionnement de l'organisme et à son développement. En effet, les acides gras présents dans les chylomicrons atteignent différents tissus et organes pour exercer des rôles cruciaux dans l'édification et le développement de ces tissus. Toutefois, les AGPI alimentaires plus particulièrement les AGPI *n*-3 et *n*-6 interviennent dans divers mécanismes physiologiques importants au sein de l'organisme, non seulement comme substrats énergétiques et composants essentiels des membranes biologiques, mais également comme molécules impliquées dans la régulation des gènes et la signalisation cellulaire. Ces AGPI sont ainsi reconnus pour lutter contre diverses pathologies.

III.1. Sources et métabolisme des AGPI

Les AGPI sont classés en deux catégories larges d'AGPI :

- La série *n*-6 dérive de l'acide gras essentiel, l'acide linoléique (LA, 18:2, *n*-6) qui se trouve dans les huiles végétales, les graines et les noix.

- La série $n-3$ dérive de l'acide alpha-linolénique (ALA 18:3, $n-3$) apporté par les huiles végétales notamment l'huile de lin (51% en poids), l'huile de soja (7% en poids), l'huile de colza (9% en poids) et l'huile de noix (6% en poids).

Ces deux acides gras subissent différentes étapes métaboliques pour former respectivement, l'acide arachidonique (AA, 20:4, $n-6$) et les acides eicosapentaénoïque (EPA, 20:5, $n-3$) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6, $n-3$). Leur synthèse se déroule principalement dans le foie, mais peut aussi avoir lieu dans les micro-vaisseaux de la barrière hémato-céphalique, les astrocytes et les cellules endothéliales microvasculaires (Moore, Yoder et al. 1990) mettant en jeu les voies de régulation de l'expression des gènes du métabolisme lipidique.

La conversion est basée sur une succession de réactions d'élongation catalysées par des élongases, ajoutant 2 carbones, et des réactions de désaturation catalysées par des désaturases, éliminant 2 atomes d'hydrogènes entre 2 carbones adjacents. Il est important de noter que les mammifères ne possèdent pas les enzymes nécessaires à l'addition d'une double liaison après le carbone C9 et sont donc incapables de synthétiser l'acide linoléique et l'acide linolénique, raison pour laquelle ces derniers sont indispensables.

L'acide α -linoléique est un acide gras d'origine végétale qui peut être converti après avoir été consommé par l'alimentation en EPA. Il a été démontré que chez l'Homme, l'acide α -linoléique est extrêmement catabolisable et très faiblement converti en DHA (Burdge and Calder 2005). L'EPA et le DHA sont abondants dans les produits animaux d'origine marine et principalement dans les poissons gras des eaux froides comme le saumon, le thon, le maquereau. On les trouve également dans les algues et dans les huiles de poisson (Whelan and Rust 2006). Le DHA ne peut pas être synthétisé directement à partir de l'EPA car il nécessite une double élongation de l'EPA en 24 :5 $n-3$ qui est désaturé en 24 :6 $n-3$ puis par β -oxydation (élimination de 2 carbones) en DHA. Inversement, un mécanisme de rétro-conversion permet la synthèse d'EPA à partir de DHA *via* un cycle d'oxydation dans les mitochondries ou dans les peroxysomes. Chez l'Homme, il a été estimé que 0,5 à 4% du DHA exogène sont rétroconvertis en EPA (Burdge 2004).

Récemment, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a réactualisé les apports nutritionnels conseillés (ANC) en lipides qu'elle avait été établis en 2001 pour mieux prévenir certaines pathologies telles que le syndrome métabolique, le diabète, l'obésité, les maladies cardiovasculaires et le cancer. Ainsi, pour prévenir ces pathologies, la part recommandée des lipides dans l'apport énergétique total (AET) chez l'adulte est de 35 à 40 %. L'ANSES apporte également de nouvelles recommandations pour

la part des AGPI indispensables ou non. L'ANC de l'acide linoléique (précurseur des $n-6$) a été fixé à 4% de l'apport énergétique, alors que celui de l'acide α -linoléique (précurseur des $n-3$) a été fixé à 1% de l'AET avec un rapport $n-6/n-3$ conseillé inférieur à 5. Des ANC ont également été fixés pour les AGPI à longue chaîne de la série oméga 3 : 250 mg par jour pour l'acide docosahexaénoïque (DHA en $n-3$) « potentiellement indispensable car il est faiblement formé à partir de l'ALA » soit deux fois plus qu'en 2001 et 250 mg par jour pour l'acide eicosapentaénoïque (EPA) « AGPI non indispensable » (AFSSA 2010) (**Tableau 2**).

Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI		
AG indispensables	Acide linoléique (LA)	4 % de l'AE soit 8,8 g/j
	Acide α -linoléique (ALA)	1 % de l'AE soit 2,25 g/j
	Acide docosahexaénoïque (DHA)	0,113 % de l'AE soit 250 mg/j
AG non indispensable	Acide eicosapentaénoïque (EPA)	0,113 % de l'AE soit 250 mg/j

Tableau 2 : Recommandations nutritionnelles conseillées en AGPI pour un adulte consommateur de 2000 Kcal (AFSSA 2010).

III.2. La peroxydation lipidique des AGPI : mécanisme et produits générés

Du fait de leur importance nutritionnelle, les acides gras polyinsaturés sont des composants importants de nombreuses formulations alimentaires. Toutefois, ces acides gras sont extrêmement sensibles à l'oxydation suite aux attaques radicalaires. Leur peroxydation est connue pour être d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est élevé.

L'oxydation non-enzymatique des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes car elle est susceptible de se produire à tous les stades de la transformation, de la conservation et de l'utilisation des produits alimentaires contenant des lipides insaturés, dès lors qu'ils sont exposés à des élévations de température, à la lumière ou en contact avec l'oxygène. Cette oxydation est responsable du rancissement des aliments, de perte en vitamines (C, E...) et de la formation des produits toxiques issus de la peroxydation lipidique (peroxydes, aldéhydes...). *In vivo*, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important car elle entraîne des dommages tissulaires et cellulaires dus à la formation des radicaux libres et de produits

d'oxydation plus réactifs conduisant à l'apparition de nombreuses pathologies (cancer, diabète, maladies cardio-vasculaires, maladie d'Alzheimer et maladies inflammatoires). Cependant, la peroxydation lipidique non enzymatique qui peut conduire à la formation des hydroperoxydes est une conséquence du stress oxydant et un relais pour sa propagation.

Les AGPI sont des cibles privilégiées des ROS. L'oxydation est également favorisée par une élévation de température, la présence d'ions métalliques (FeII ou FeIII, CuI), d'hydroperoxydes préexistants, de systèmes enzymatiques produisant des ROS ou de catalyseurs enzymatiques (lipoxygénase) (Cosgrove, Church et al. 1987).

Le processus général de ce mécanisme consiste en une réaction radicalaire en chaîne qui se déroule en 3 phases : initiation, propagation et terminaison (Frankel 2005) (**Figure 15**).

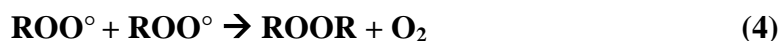
- **Initiation** : elle consiste en la soustraction d'atome d'hydrogène du groupement méthylène d'un AGPI ce qui conduit à la formation d'un radical d'acide gras libre (R°) (1). Plusieurs espèces peuvent arracher l'atome d'hydrogène comportant l'hydroxyl (HO°), alkoxy (RO°), peroxy (ROO°).



- **Propagation** : le radical alkyle formé dans l'étape d'initiation réagit très rapidement avec O_2 pour donner un *radical peroxy* (ROO°) (2). Ce ROO° peut arracher un hydrogène d'un AGPI adjacent aboutissant à la formation d'un *hydroperoxyde* d'acide gras $ROOH$ instable et un second radical libre assurant la propagation de réaction (3).



- **Terminaison** : elle aboutit à la formation d'un radical stable obtenu soit par association de deux espèces radicalaires qui se neutralisent (4), soit par l'intervention de molécules antioxydantes qui provoquent la terminaison de la propagation en piégeant les radicaux peroxydes (5).



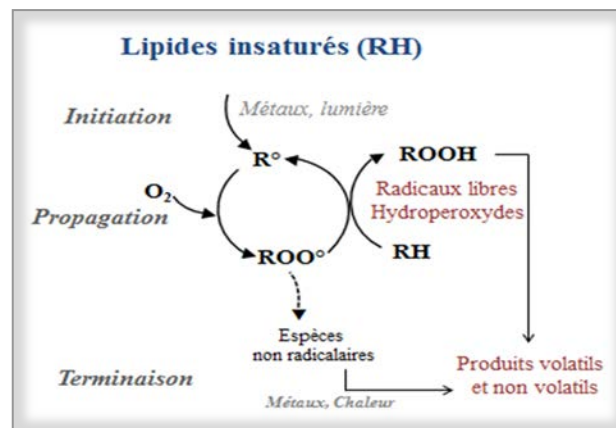


Figure 15 : Schéma décrivant le processus de l'oxydation des lipides (adapté de (Genot and Michalski 2010)).

Toutefois, les antioxydants pourraient empêcher ou ralentir la propagation de la peroxydation lipidique en réagissant avec les radicaux libres générés et en formant des composés moins réactifs que les hydroperoxydes. Ces derniers formés dans l'étape de propagation sont instables, ils peuvent se décomposer pour donner des nouveaux radicaux libres provoquant l'oxydation des biomolécules mais aussi des aldéhydes réactifs.

Les principaux aldéhydes stables formés sont le dialdéhyde malonique (MDA) qui est reconnu comme étant un biomarqueur de la peroxydation lipidique (Mateos, Lecumberri et al. 2005) et les 4-hydroxy-alkénals,* notamment le 4-hydroxy-nonéanal (4-HNE) provenant de l'oxydation de la série *n*-6 des AGPI (Porter, Caldwell et al. 1995) et le 4-hydroxy-hexéanal (4-HHE) dérivant de l'oxydation de la série *n*-3 des hydroperoxydes (**Figure 16**) (van Kuijk, Thomas et al. 1986).

*Au cours de ce manuscrit, le terme « 4-hydroxy-alcéanal » a été remplacé par le « 4-hydroxy-alkéanal » (mot anglais)

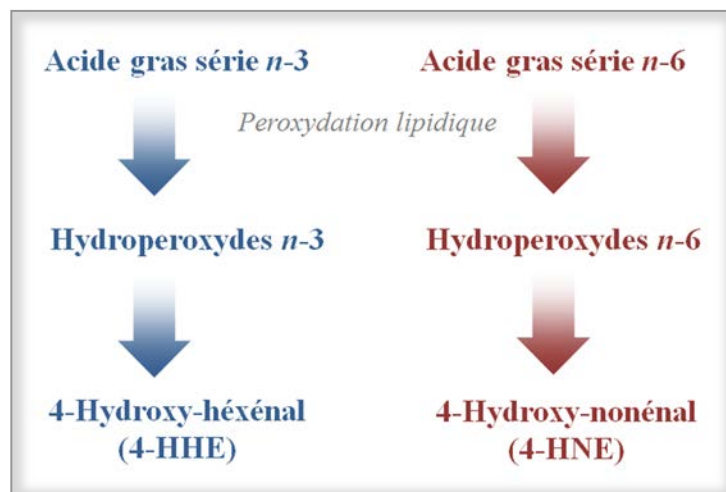


Figure 16 : Les 4-hydroxy-alkénals, des produits secondaires de l'oxydation des acides gras polyinsaturés *n-6* et *n-3* très réactifs.

III.3. Les 4-hydroxy-alkénals

Le 4-HNE a été décrit pour la 1^{ère} fois en 1967 par Schauenstein dans les produits d'auto-oxydation de l'ester méthylique du linoléate (Schauenstein 1967). Des études ont été ensuite réalisées par Esterbauer et ses collègues à partir de 1985 pour élucider le mécanisme de formation du 4-HNE et du 4-HHE dans différents systèmes biologiques en réponse aux stimuli de la peroxydation lipidique (Poli, Dianzani et al. 1985).

III.3.1. Structure

Le 4-HHE et le 4-HNE possèdent respectivement 6 et 9 carbones. Ils comportent en commun 3 groupes fonctionnels qui expliquent leur réactivité : un hydroxyle en position 4, une double liaison entre les carbones 2 et 3 et une fonction aldéhyde sur le carbone 1 (**Figure 17**). Ce sont des molécules amphiphiles, miscibles dans l'eau grâce aux groupements aldéhyde et alcool solubles dans les lipides grâce à leur queue hydrophobe. Le 4-HNE possède plus de carbone que le 4-HHE, il est donc considéré comme étant une molécule plus lipophile et plus réactive que le 4-HHE.

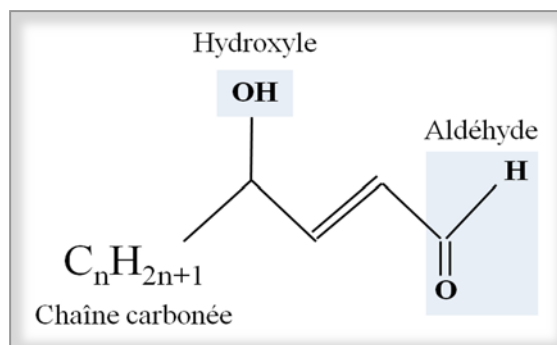


Figure 17 : Structure chimique des 4-hydroxy-alkénals.

Les 4-hydroxy-alkénals sont détectés grâce à des techniques de chromatographie en phase gazeuse couplée de la spectrométrie de masse et des techniques de chromatographie liquide haute performance qui peuvent être couplées à de nombreux systèmes de détection spectrophotométrique ou fluorimétrique.

III.3.2. Réactivité

Le 4-HNE est accumulé dans les membranes cellulaires à des concentrations allant jusqu'à 10 à 20 μM en réponse à des dommages oxydatifs (Esterbauer and Zollner 1989; Esterbauer, Schaur et al. 1991; Uchida 2003). Dans le plasma humain, le 4-HHE est présent en quantités 2 à 3 fois supérieure au 4-HNE. Ces aldéhydes sont reconnus comme des marqueurs du stress oxydant *in vivo* et *in vitro*, capables de traverser les membranes et d'atteindre d'autres compartiments cellulaires en agissant comme «second messenger» (Esterbauer, Schaur et al. 1991). Ils ont une durée de vie plus longue que les radicaux libres les rendant ainsi plus toxiques. Leur toxicité réside surtout dans leur capacité à former des adduits avec les protéines, les lipides, l'ADN, les phospholipides et les biomolécules contenant des groupements nucléophiles amines ou thiols (Petersen and Doorn 2004). Ces adduits ont été identifiés comme des adduits de Michael et des bases de Schiff (Guichardant, Taibi-Tronche et al. 1998; Bacot, Bernoud-Hubac et al. 2007). En effet, les 4-hydroxy-alkénals sont des composés électrophiles capables de réagir avec les résidus cystéines, histidines et lysines des protéines et des peptides (Uchida 2003). La réaction de ces 4-hydroxy-alkénals implique formation d'une liaison covalente entre le carbone 3 des 4-hydroxy-alkénals et les groupements amines ou thiols des protéines pour donner des adduits de Michael.

Ces adduits peuvent ainsi se cycliser par déshydratation interne en un hémiacétal cyclique plus stable (**Figure 18**). De plus, il peut se produire une réaction entre le groupement carbonyle de l'aldéhyde et le groupement amine d'une molécule cible aboutissant à la formation d'une base de Schiff.

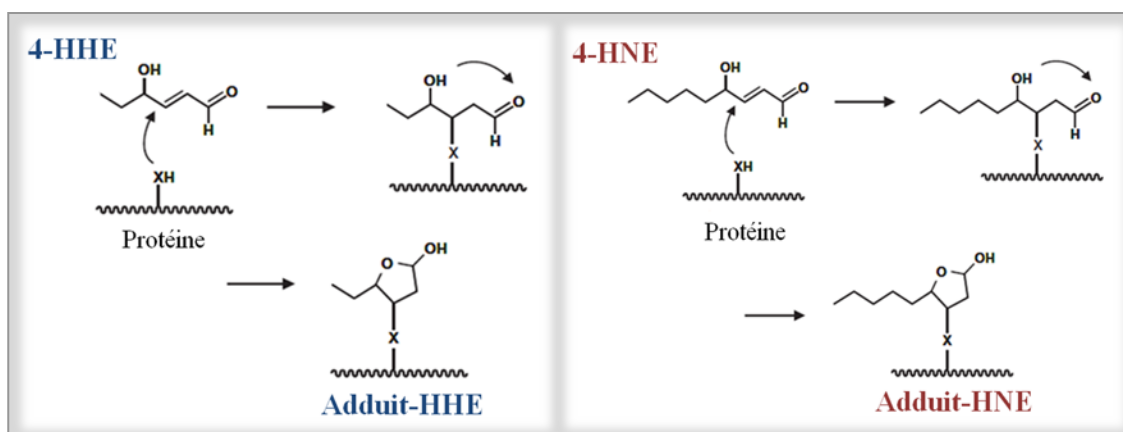


Figure 18 : Mécanisme d'addition de Michael par les 4-hydroxy-alkénals.

Au niveau cellulaire, la réaction de détoxification des 4-hydroxy-alkénals peut avoir lieu en cas de présence d'une grande quantité de glutathion qui contient un groupement thiol. Cette réaction permet aux cellules de réduire ou d'éliminer les composés aldéhydes toxiques en engendrant un adduit glutathion-hydroxy-alkénal.

Toutefois, la formation des adduits de Michael, en altérant la structure de la molécule peut entraîner une perte partielle ou totale dans sa fonction ce qui induit un stress cellulaire. De nombreuses études ont rapporté l'implication de ces adduits dans la progression de diverses pathologies comme le cancer, l'athérosclérose, les maladies intestinales chroniques et les maladies neurodégénératives (Shibata, Yamada et al. 2004; Marquez-Quinones, Cipak et al. 2010; Bradley, Xiong-Fister et al. 2012).

III.3.3. Métabolisme

Les 4-hydroxy-alkénals sont métabolisés au niveau du foie en différents métabolites notamment chez l'homme en acides carboxyliques sécrétés dans les urines. Les principales enzymes impliquées dans le métabolisme du 4-HNE sont: les GSH transférases, les aldéhydes

déshydrogénases et les alcools déshydrogénases. Dans les hépatocytes et les mitochondries, les métabolites principaux du 4-HNE seraient le GSH conjugué, l'acide carboxylique correspondant, «l'acide 4-hydroxy-2-nonénoïque» et l'alcool correspondant, «le 1,4-dihydroxynonène (DHN)». Le 4-HHE est également métabolisé par la glutathion transférase en composés moins réactifs ou par l'aldéhyde déshydrogénase en acide carboxylique « le 4-hydroxy-hexénoïque (4-HHA) ». Les acides urinaires tels que le 4-HNA et le 4-HHA peuvent être mesurés par Chromatographie en phase gazeuse « GC-MS » sous forme de dérivés pentafluorobenzyl et heptafluorobenzyl esters (Guichardant, Bacot et al. 2006).

III.3.4. 4-hydroxy-hexénoïque (4-HHE)

Le 4-HHE est connu pour exercer des effets plus ou moins délétères. Parmi les 4-hydroxy-alkénals, il est le plus abondant dans le plasma et les urines (Guichardant, Bacot et al. 2006). Le 4-HHE est considéré comme une molécule physiologiquement moins active et moins toxique que le 4-HNE du fait de son faible caractère lipophile et de sa moindre réactivité chimique (Long and Picklo 2010). En plus, les effets de 4-HHE sur la régulation et la signalisation cellulaire dans les conditions physiologiques sont jusqu'à présent moins élucidés que ceux du 4-HNE.

Les travaux les plus cités portent sur l'implication du 4-HHE dans l'induction de l'inflammation et de l'apoptose. En effet, des travaux *in vitro*, sur les cellules endothéliales YPEN-1, ont démontré que le 4-HHE, à des concentrations modérées entre 10 et 30 μM , serait impliqué dans la génération de l'inflammation en activant le facteur de transcription NF- κB qui joue un rôle clé dans la régulation de certains gènes pro-inflammatoires et pro-apoptotiques. De plus, ces études ont montré une diminution du niveau de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une forte production des ROS et de peroxy-nitrite, altérant ainsi les activités vasculaires de ces cellules endothéliales (Lee, Je et al. 2004). Une étude plus récente a rapporté également les mêmes effets apoptotiques du 4-HHE dans les cellules épithéliales du tube rénal proximal (Bae, Cho et al. 2011). Récemment, Pillon et al ont démontré *in vitro* sur les cellules musculaires L6 et adipocytaires 3T3-L1 et *in vivo* sur les souris, que le 4-HHE pourrait être impliqué dans le développement de l'insulino-résistance en perturbant la fonction biologique de l'insuline par la formation d'adduits de Michael sur l'insuline, empêchant ainsi la capture de glucose par les cellules (Pillon, Vella et al. 2011).

D'autres études *in vivo* ont rapporté l'implication du 4-HHE dans l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale provoquant ainsi une perturbation dans l'homéostasie calcique et conduisant à l'apoptose (Kristal, Park et al. 1996).

Chez l'Homme, une étude très récente a confirmé l'implication de la peroxydation lipidique et plus précisément le rôle du 4-HHE dans la progression de la maladie d'Alzheimer. Bradley *et al.* ont trouvé chez les sujets atteints d'Alzheimer que le 4-HHE forme des adduits avec les protéines dans l'hippocampe et dans d'autres régions du cerveau (Bradley, Xiong-Fister et al. 2012).

III.3.5. 4-hydroxy-nonéanal (4-HNE)

Le 4-HNE dérivant de l'oxydation des AGPI *n*-6 est l'hydroxy-alkénel le plus étudié en chimie et en biologie. Il se caractérise par sa forte réactivité chimique et son caractère lipophile important. Ainsi, il est connu à la fois comme un marqueur de la peroxydation lipidique et un médiateur du stress oxydant (Uchida, 2003).

De nombreuses revues générales concernant les activités biologiques du 4-HNE ont été publiées ces dernières années du fait de sa très grande réactivité. Ses effets cytotoxiques et sa fonction dans la signalisation cellulaire sont très étudiés. Dans le plasma sanguin, la concentration physiologique de 4-HNE est estimée entre 0,5 et 1,4 $\mu\text{mol/L}$ (Esterbauer, Schaur et al. 1991). Toutefois, en conditions pathologiques, cette concentration est multipliée par 2 ou 3 (Quinlan, Lamb et al. 1996; McGrath, McGleenon et al. 2001).

Sur différents types de cellules en culture et selon les concentrations de 4-HNE utilisées, des activités prolifératives ou anti-prolifératives, ainsi que pro- ou anti-apoptotiques ont été observées (Cheng, Singhal et al. 1999; Camandola, Poli et al. 2000; Ruef, Moser et al. 2001; Awasthi, Sharma et al. 2003; Leonarduzzi, Robbesyn et al. 2004; Pizzimenti, Menegatti et al. 2010).

▪ **4-HNE une molécule de signalisation cellulaire**

Le 4-HNE n'est pas toujours considéré comme étant un élément cytotoxique. De nombreux auteurs considèrent que le 4-HNE est une molécule intermédiaire dans la signalisation intracellulaire plutôt qu'un produit toxique de la peroxydation lipidique. Le 4-HNE semble moduler les fonctions de différents types cellulaires, l'expression de certains gènes et les différentes voies biochimiques intracellulaires (Awasthi, Ansari et al. 2005).

Certains résultats ont montré qu'à faible concentration ($\leq 1\mu\text{M}$), le 4-HNE stimule la prolifération des cellules K562 et HLE B-3, modèles de la lignée cellulaire des muscles lisses, en activant la voie de signalisation extracellulaire signal-regulated kinase (ERK) qui est impliquée dans la prolifération des muscles lisses des cellules aortiques (Ruef, Rao et al. 1998; Cheng, Singhal et al. 1999; Awasthi, Sharma et al. 2003). A l'inverse, une étude réalisée sur des cellules HL-60 a montré qu'une concentration physiologique de 4-HNE est capable d'inhiber la prolifération et d'induire la différenciation des granulocytes (Barrera, Pizzimenti et al. 1996).

Une étude récente a montré que le 4-HNE ($1\mu\text{M}$) exerce un effet anti-carcinogénique sur les cellules Caco-2 non différenciées *via* l'inhibition de l'activité de télomérase (Pizzimenti, Menegatti et al. 2009).

Les modifications de certaines réponses cellulaires induites par le 4-HNE sont rapportées également à la protection contre le stress oxydant. Une étude réalisée par Niki et ses collègues sur les cellules PC12, modèle de lignée cellulaire neuronale, a montré l'effet non toxique du 4-HNE sur l'activation de l'expression génique de certaines enzymes antioxydantes par le biais de l'activation de NF-E2 liée au facteur de transcription 2 (Nrf2) (Niki 2009).

▪ 4-HNE et apoptose

Un grand nombre d'études s'intéressent aux effets toxiques du 4-HNE et surtout à son rôle dans l'induction de l'apoptose et de la mort cellulaire. En effet, de nombreuses études réalisées sur différentes lignées cellulaires ont montré que le 4-HNE active des caspases entraînant les cellules dans l'apoptose et diminuant leur viabilité. Parmi ces voies, on cite: la c-Jun-N-terminal kinase (JNK), l'activator protein-1 «AP-1», les récepteurs de tyrosine kinase, (Akt /PKB kinase) et la p38 mitogen-activated protein kinase (P38 MAPK) (Leonarduzzi, Robbesyn et al. 2004; Biasi, Vizio et al. 2006; Kutuk and Basaga 2007). Dans la plupart des cas, les effets toxiques du 4-HNE ont été attribués à la formation des produits d'addition après interaction du 4-HNE avec les sites de liaison ou les sites catalytiques des protéines contenant des résidus cystéines, histidines ou lysines.

Le mécanisme de mort cellulaire induite par le 4-HNE au niveau des mitochondries a été également étudié. Rasa et al ont montré que le 4-HNE altère la fonction des mitochondries en perturbant différentes voies comme la surproduction des ROS, la déplétion de l'activité antioxydante du glutathion, et la libération des cytochromes c vers le cytosol, qui activent à leur tour la cascade des caspases et les protéines pro-apoptotiques, induisant ainsi l'apoptose (Raza and John 2006).

Certaines études se sont intéressées à l'interaction du 4-HNE avec la voie de signalisation de NF- κ B. Leurs résultats sont contradictoires. En effet, les résultats obtenus sont dépendants de la concentration de 4-HNE et du modèle cellulaire utilisé. Par exemple, Ruef et ses collègues ont montré que le 4-HNE à faible concentration (1 μ M) est capable de stimuler l'activation de NF- κ B *in vitro* dans les cellules musculaires vasculaires (Ruef, Moser et al. 2001). Cependant, l'incubation de différentes lignées cellulaires avec différentes concentrations de 4-HNE induit essentiellement des effets inhibiteurs. En effet, à des fortes concentrations (30-50 μ M), il a été démontré que le 4-HNE peut former des adduits avec le complexe IKK, ce qui inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Ji, Kozak et al. 2001). De plus, le 4-HNE peut inhiber la phosphorylation de I κ B dans les monocytes THP-1 (Page, Fischer et al. 1999) et dans des cellules endothéliales aortiques humaines (Minekura, Kumagai et al. 2001) après activation par le LPS. A de faibles concentrations (0.1-10 μ M), le 4-HNE diminue l'expression de l'IL-6 dans les cellules macrophagiques de Kupffer *via* la diminution de l'expression de NF- κ B et la stabilisation de l'activité d'I κ B après stimulation avec de LPS (Luckey, Taylor et al. 2002).

Récemment, quelques équipes de recherche se sont intéressées pour la première fois aux effets toxiques du 4-HNE sur l'induction du stress du RE. Vladykovskaya et al. ont identifié des adduits HNE-protéines accumulés dans le RE des cellules endothéliales et ont observé une activation des protéines UPR et de l'expression génique de la protéine chaperonne GRP78 (indicateur du stress du RE) (Vladykovskaya, Sithu et al. 2012). Plus récemment, une autre étude a montré également une induction du stress du RE par le 4-HNE *via* l'activation de l'eIF2 α , de l'ATP6 et de la protéine pro-apoptotique CHOP au niveau des cellules Muller de la rétine (Wu, Yang et al. 2012).

Toutefois, il est important de noter qu'au cours du stress du RE, un mécanisme d'autophagie peut avoir lieu afin de favoriser la survie des cellules en éliminant les protéines endommagées. Cependant, une autophagie excessive peut également entraîner la mort cellulaire (Eisenberg-Lerner, Bialik et al. 2009). Récemment, il a été rapporté que le 4-HNE était impliqué dans l'induction de l'autophagie dans les cellules musculaires vasculaires (Hill, Haberzettl et al. 2008).

IV. Effets des AGPI sur les marqueurs du syndrome métabolique et implication de leurs produits d'oxydation

IV.1. Effets bénéfiques des AGPI *n-3* sur la santé

Les lipides jouent un rôle crucial dans de nombreux processus liés à la survie, la croissance et la différenciation cellulaire. Récemment, les AGPI de la série *n-3*, notamment l'EPA et le DHA, sont apparus comme étant des lipides d'une importance prioritaire pour la santé humaine.

Le DHA est l'AG le plus représenté chez les mammifères. Il est le constituant fondamental du cerveau (40% des AGPI) et de la rétine (60% des AGPI) d'où son rôle essentiel dans le développement de ces deux organes riches en cellules nerveuses. Il joue ainsi un rôle important dans l'acuité visuelle et le développement cérébral (Stillwell 2008) mais aussi dans la formation et la motilité des spermatozoïdes.

Depuis les années 1970, les effets bénéfiques des AGPI *n-3* ont été observés sur les maladies cardiovasculaires et plus particulièrement sur les maladies coronariennes. Il a été démontré que les AGPI *n-3* exercent leurs effets cardio-protecteurs par différents mécanismes notamment par la réduction des arythmies et par la modification de la production des prostaglandines ce qui réduit l'inflammation et améliore la fonction endothéliale et plaquettaire (Wang, Harris et al. 2006; Bays 2008). En outre, l'EPA et le DHA ont la capacité d'inhiber la synthèse hépatique et la sécrétion des VLDL et d'augmenter l'élimination des TG situés dans les chylomicrons et les particules des VLDL, induisant ainsi une diminution du taux plasmatique des TG (Harris 1997). Des études montrent également qu'ils peuvent diminuer la pression sanguine (Geleijnse, Giltay et al. 2002), l'agrégation plaquettaire (Din, Harding et al. 2008), le risque de diabète et d'obésité (Storlien, Hulbert et al. 1998), le stress oxydant (Mori 2004), le cancer et les maladies auto-immunes (Adam, Beringer et al. 2003).

IV.2. Impact métabolique des molécules vectrices d'AGPI *n-3*

Des études réalisées chez les rongeurs ont montré une meilleure incorporation des acides gras de la série *n-3* dans les lipides plasmatiques, hépatiques et cérébraux lorsqu'ils sont apportés *via* des liposomes préparés à partir de PL d'origine marine par rapport à des TG (Cansell, Nacka et al. 2003; Cansell, Moussaoui et al. 2006; Tang, Li et al. 2012). L'apport de lipides marins chez les rongeurs sous forme de TG ou de PL induit aussi des effets différents sur le métabolisme lipidique. En effet, il a été démontré chez le rat que l'effet hypotriglycéridémiant des AG *n-3* est

similaire qu'ils soient apportés sous forme de PL ou de TG pendant 2 semaines (Cansell, Moussaoui et al. 2006). En revanche, l'ingestion de DHA sous forme de PL par les souris diminuait le taux de triglycérides et de cholestérol plasmatique et hépatiques après une semaine de régime riche en DHA (Tang, Li et al. 2012).

Dans plusieurs essais cliniques réalisés chez l'Homme, des différences ont été observées entre l'huile de krill riche en PL et l'huile de poisson qui en est pratiquement dépourvue (Bunea, El Farrah et al. 2004; Kidd 2007; Tou, Jaczynski et al. 2007). Par exemple, la consommation d'huile de krill pendant 3 mois semble plus efficace que l'huile de poisson pour réduire la glycémie, la triglycéridémie et le cholestérol LDL chez des patients hypercholestérolémiques (Bunea, El Farrah et al. 2004). Une étude clinique récente a aussi montré un effet similaire de l'huile de krill riche en PL par rapport à l'huile de poisson sur l'augmentation des DHA et EPA plasmatiques, sur les teneurs en lipides plasmatiques, en marqueurs du stress oxydant et de l'inflammation, malgré le fait que la dose d'EPA+DHA apportée par l'huile de krill était environ 63% de la dose apportée par l'huile de poisson (Ulven, Kirkhus et al. 2011).

IV.3. Impact des AGPI à longue chaîne sur le stress oxydant métabolique

Le syndrome métabolique est défini par un ensemble de perturbations métaboliques qui prédispose fortement au développement de maladies cardiovasculaires et à la survenue du diabète de type II. Outre une concentration circulante en triglycérides dans le sang élevée, les maladies métaboliques d'origine nutritionnelle comme l'obésité et le diabète de type II sont caractérisées par un stress oxydant métabolique. L'excès de radicaux libres et du stress oxydant concourent au développement de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose et ses complications ischémiques, coronaires et cérébrales, les maladies neurodégénératives, les complications du diabète et les phénomènes inflammatoires.

De nombreux travaux ont étudié l'impact de différentes doses d'AGPI sur le stress oxydant et les processus inflammatoires, ces deux phénomènes étant impliqués dans diverses pathologies humaines dont le syndrome métabolique. Ainsi, une alimentation riche en AGPI *n-3* pourrait protéger contre diverses maladies incluant les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II et la maladie d'Alzheimer.

En outre, l'EPA et le DHA jouent un rôle particulier chez les sujets atteints d'un syndrome métabolique ou chez les diabétiques. En effet, au côté de leurs effets hypotriglycéridémiants, précieux pour traiter les dyslipidémies dans le syndrome métabolique, les AGPI-LC *n-3*

modulent également la tolérance au glucose, la réponse insulinique (Lovejoy 2002) et l'excitabilité du muscle cardiaque (Sirtori and Galli 2002). Ils freinent aussi l'induction du diabète (Suresh and Das 2003).

Leur impact sur le métabolisme lipidique général a été bien étudié. Leur rôle majeur consiste ainsi à promouvoir la lipolyse, l'oxydation des acides gras et à inhiber la lipogénèse. Du point de vue du stress oxydant, certains auteurs ont observé que l'EPA et le DHA jouent un rôle important dans la lutte contre le stress oxydant chez les sujets sains (Mori, Puddey et al. 2000) ou chez les patients diabétiques de type II (Mori, Woodman et al. 2003). Chez l'Homme, l'ingestion des doses faibles d'EPA (100 mg/j) ou d'EPA+DHA (180 mg/j) est capable de s'opposer au stress oxydant dans les plaquettes sanguines et ainsi d'épargner la vitamine E (Croset, Vericel et al. 1990; Vericel, Calzada et al. 1999)

Cependant, l'utilisation massive de ces AGPI-LC *n*-3 en nutrition pourrait ne pas être sans danger sur l'organisme puisque plusieurs études ont montré que la consommation de grande quantité d'AGPI, molécule très oxydable, rend la totalité du système plus sensible à l'oxydation. Ceci est peu étonnant si l'on considère la forte insaturation de ces molécules et le fait que le nombre d'hydroperoxydes possibles formés à partir de ces AGPI croît plus vite que le nombre de leurs doubles liaisons.

Les effets indésirables d'une forte consommation d'AGPI *n*-3 sur les organes, le sang et les urines ont été récemment bien élucidés et étudiés *in vivo* et *in vitro*. Il est à noter que ces AGPI *n*-3 sont facilement oxydables en subissant une auto-oxydation dans les conditions atmosphériques notamment en absence d'antioxydants. Ceci a été bien démontré en 1988 par Fristiche et Johnston qui ont trouvé des hydroperoxydes à des taux élevés dans une diète contenant des huiles des poissons dépourvue d'antioxydants et exposée à l'air atmosphérique (Fritsche and Johnston 1988). Cependant, Gonzalez et ses collègues ont trouvé que l'addition d'antioxydants synthétiques au régime alimentaire riche en huiles des poissons diminue la production des produits de peroxydation lipidique dans les différents organes des souris soumises à ce régime. En revanche, cette addition semble insuffisante pour inhiber complètement la dégradation oxydative des AGPI présents dans le régime (Gonzalez, Gray et al. 1992).

Des études récentes semblent indiquer que la consommation en excès d'EPA +DHA (1% des apports énergétiques totaux) pourrait être impliquée dans le stress oxydant chez le rat (Park, Nam et al. 2009). Chez l'Homme, les effets d'une consommation de DHA en doses croissantes (200, 400, 800 et 1600 mg/j) sur le système redox et l'activité des plaquettes sanguines ont été récemment étudiés sur des personnes âgées. A faible dose de DHA (200 mg/j), le niveau du

stress oxydant reste faible, comme en témoigne notamment le taux de vitamine E dans les plaquettes sanguines et l'on peut même considérer cet apport comme ayant un effet antioxydant. Cependant, un stress oxydant accru a été observé avec la plus forte consommation de DHA (1600 mg/j) (Guillot, Caillet et al. 2009). D'autres études chez l'Homme ont montré l'apparition d'un stress oxydant métabolique après ingestion de quantités élevées d'AGPI-LC *n*-3 (> 2 g/j), incluant le DHA (>500 mg/j) (Brown and Wahle 1990; Meydani, Natiello et al. 1991; Allard, Kurian et al. 1997). Récemment, il a été démontré chez les souris, qu'une consommation à long terme des AGPI-LC *n*-3 dans l'alimentation induit un stress oxydant marqué par une oxydation accrue des phospholipides membranaires et une diminution de la défense anti-oxydante due à la déplétion des tocophérols (Tsuduki, Honma et al. 2011). Selon les auteurs, de tels effets pourraient être impliqués dans la dysfonction cellulaire et induire le vieillissement. Dans le même contexte, une autre étude réalisée sur les lapins a montré une augmentation des adduits 4-HHE-protéines dans les cellules hépatiques après ingestion à long terme d'AGPI-LC *n*-3 à forte dose (Gladine, Roy et al. 2011). Les auteurs interprètent ces résultats comme venant d'une surproduction hépatique endogène de 4-HHE (**Tableau 3**).

Comme les AGPI *n*-3, les aliments riches en AGPI *n*-6 (présents dans la viande rouge et les charcuteries) peuvent avoir des effets néfastes sur l'organisme en favorisant la progression de certaines pathologies comme le cancer. En effet, il a été rapporté récemment une relation entre la consommation de viande rouge et le risque de cancer colorectal. Dans cette étude, du 4-HNE a été détecté dans les fèces des rats ayant consommé ce régime (Pierre, Tache et al. 2007). Selon les auteurs, ceci est dû à la présence d'hème dans la viande rouge qui catalyse à son tour l'oxydation des AGPI *n*-6 aussi bien au niveau de l'aliment que dans le tube digestif conduisant ainsi à la formation des produits d'oxydation tels que le 4-HNE.

D'après ces résultats, nous posons la question suivante dans le contexte des recommandations nutritionnelles en AGPI *n*-3 ou *n*-6: si les lipides correspondants contiennent une certaine quantité de produits secondaires d'oxydation du fait de manque de précautions au cours de leur préparation ou de leur conservation, pourraient-ils de ce fait exercer certains effets délétères?

AGPI <i>n</i> -3	Dose	Durée	Modèle d'étude	Effets	Référence
EPA+DHA	180 (mg/j)	4 semaines	Sujets sains	↓ pression sanguine ↓ MDA ↑ vitamine E	Véricel et <i>al.</i> 1999
EPA+DHA	4 (g/j)	6 semaines	Sujets diabétiques de type 2	↓ isoprostanes F2	Mori et <i>al.</i> 2003
EPA+DHA	40 % de volume d'huile	6 semaines	Souris obèses <i>db/db</i>	↓ l'infiltration macrophagique ↑ adiponectine	Todoric et <i>al.</i> 2006
DHA	0,2- 0,8 (g/j)	8 semaines	Sujets sains	↓ MDA ↑ tocophérols	Calzada et <i>al.</i> 2010
EPA+DHA	1,6 (g/j)	8 semaines	Sujets sains	↑ 4-HHE ↓ vitamine E	Calzada et <i>al.</i> 2010
EPA+DHA	8.6 (g/j)	28 semaines	Souris SAMP8	- Hydroxydation des PL membranaires - Depletion des tocophérols	Tsuduki et <i>al.</i> 2011
DHA	1 % d'apport énergétique	7 semaines	Lapin	↑ 4-HHE-protéines - Accumulation des TG dans le foie	Gladine et <i>al.</i> 2011

Tableau 3 : Etudes relatant des effets des AGPI-LC *n*-3 sur des marqueurs associés au stress oxydant.

IV.4. Impact métabolique de l'absorption intestinale en AGPI oxydés et de leurs produits d'oxydation

IV.4.1. Teneur en 4-hydroxy-alkénals dosés dans les aliments

Depuis quelques années dans une démarche de qualité et de toxicologie alimentaires, les scientifiques spécialisés en nutrition et les industriels de l'agroalimentaire cherchent de plus en plus à caractériser les produits d'oxydation des AGPI dans les aliments, et plus particulièrement dans les aliments conseillés pour apporter ces AGPI-LC *n*-3 et *n*-6.

Quelques études ont pu mettre en évidence la présence de produits d'oxydation des AGPI *n*-3 et *n*-6 dans des aliments du quotidien. Récemment, Halvorsen et *al.* ont mesuré les teneurs en alkénals dans 33 compléments d'oméga 3 à base d'huile de poisson et dans 12 huiles végétales commerciales fraîches ou après cuisson (chauffage de 25 minutes à 225°C). Les teneurs en alkénals totaux étaient en moyenne nettement plus élevées dans les compléments à base d'huile de poisson (158-932 nmol/ml) que dans les huiles végétales (33-119 nmol/ml). Cela s'explique par la richesse des huiles de poisson en AGPI-LC *n*-3 (EPA+DHA) qui sont plus facilement

oxydables que les acides gras mono- et polyinsaturés. En exposant les huiles végétales à la chaleur, les teneurs en alkénals dosés dans ces huiles oxydées étaient beaucoup plus élevées (200-550 nmol/ml) par rapport aux huiles végétales fraîches mais moins élevées par rapport aux compléments d'oméga 3 (Halvorsen and Blomhoff 2011). Cependant, le 4-HHE et le 4-HNE n'ont pas été mesurés séparément dans cette étude ce qui empêche de faire d'éventuelle comparaison avec d'autres travaux.

Les teneurs en 4-hydroxy-alkénals ont été également mesurées dans d'autres aliments comme dans les laits infantiles. Par exemple, le rapport 4-HHE/AGPI *n*-3 dans le lait infantile industriel s'élève à 4,9 µg/g d'AGPI *n*-3. Ce niveau est beaucoup moins élevé dans le lait maternel (0,19 µg/g). Le rapport 4-HNE/AGPI *n*-6 est également plus élevé dans le lait industriel (0,2 à 1,1 µg/g) en comparaison avec le lait maternel (0,004 µg/g). La présence plus importante de produits d'oxydation dérivés des AG *n*-3 ne s'explique pas par une plus grande quantité de ces AG dans le lait mais plutôt par le fait que les AG *n*-3 sont plus sensibles à l'oxydation que les AG *n*-6 (Michalski, Calzada et al. 2008). Du 4-HHE et du 4-HNE ont également été détectés dans certains produits alimentaires enrichis en AGPI comme les laits infantiles (< 10-77 µg/kg pour 4-HHE et 41-132 µg/kg pour 4-HNE) et les aliments pour nourrissons (< 10-52 µg/kg pour 4-HHE et 36-116 µg/kg pour 4-HNE) (Surh, Lee et al. 2007). De plus, il a démontré que l'enrichissement en DHA des œufs de poules *via* leur alimentation conduit à une augmentation de DHA dans les œufs, toutefois cette augmentation s'accompagne d'une augmentation du 4-HHE dans les œufs. L'ajout de vitamine E à l'alimentation permet d'éviter la formation de ce produit d'oxydation (Grune, Kramer et al. 2001). Cette corrélation entre teneur en AGPI et présence de produits d'oxydation a également été mise en évidence pour le 4-HNE qui a été détecté dans des viandes de bœuf et de porc, produits riches en AGPI *n*-6 (Sakai, Kuwazuru et al. 1995; Munasinghe, Ichimaru et al. 2003). L'ensemble de ces études montrent que les AGPI *n*-6 et *n*-3 présents dans les aliments, soit de manière naturelle soit suite à la transformation des produits, sont susceptibles de s'oxyder. Par conséquent, la consommation de ces produits par l'Homme l'expose à l'ingestion de ces produits d'oxydation. Toutefois, d'autres études devraient être nécessaires dans ce domaine afin de déterminer les doses de sécurité pour éviter une éventuelle toxicité biologique de ces produits secondaires d'oxydation des lipides déjà présents dans les aliments.

IV.4.2. Devenir des produits d'oxydation des AGPI

A l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée quantitative fiable quant à l'ingestion des produits d'AGPI oxydés présents dans l'alimentation au niveau du système gastro-intestinal. Peu d'études ont été spécifiquement consacrées à la formation des produits secondaires de l'oxydation des lipides considérés comme cyto- ou géno-toxiques tels que le 4-HHE et le 4-HNE. Récemment, une étude a été réalisée sur un modèle digestif *in vitro* afin d'évaluer le devenir des produits d'oxydation des AG *n*-3 et *n*-6 dans les huiles végétales préalablement oxydées thermiquement. Dans cette étude, le 4-HHE et le 4-HNE ont été détectés après leur digestion *in vitro* (Goicoechea, Brandon et al. 2011). Selon ces auteurs, les 4-hydroxy-alkénals demeurent donc présents en fin de digestion et seraient ainsi capables d'être ensuite absorbés par les cellules intestinales pour gagner finalement la circulation sanguine et réagir avec leurs cibles biomoléculaires.

Quelques études donnent des pistes de recherche sur le rôle des composés d'oxydation des AGPI alimentaires dans la génération d'un stress oxydant métabolique. Les produits primaires de l'oxydation, les hydroperoxydes, sont des composés très toxiques lorsqu'ils sont administrés par voie intraveineuse. Les premiers travaux portant sur les conséquences de l'ingestion de ces composés sur la santé laissaient néanmoins penser que les hydroperoxydes alimentaires ne franchissaient pas la barrière intestinale et étaient éliminés dans les fèces. Par ailleurs, il avait été montré que, en dehors des situations pathologiques, les composés radicalaires et les hydroperoxydes formés *in vivo* étaient détoxifiés au travers d'un cycle enzymatique où intervient la glutathion peroxydase. Cependant, des travaux font apparaître que les composés peroxydés apportés par le bol alimentaire peuvent s'accumuler dans le lumen intestinal et contribuer au développement de désordres intestinaux chroniques ou de pathologies tels que des cancers (Kanazawa and Ashida 1998a; Kanazawa and Ashida 1998b).

Chez l'Homme, la consommation d'un repas comportant des triglycérides incluant des AGPI oxydés hydroxylés ou des hydroperoxydes aboutit à la présence de ces acides gras hydroxylés dans les chylomicrons et dans la circulation sanguine dans les heures suivant le repas (Ursini, Zamburlini et al. 1998; Wilson, Lyall et al. 2002). Toutefois, aucune donnée n'est disponible à notre connaissance concernant l'absorption de 4-hydroxy-alkénals.

IV.4.3. Effets délétères des produits d'oxydation des AGPI

La muqueuse intestinale est la première en contact avec les produits d'origine alimentaire. Cependant, les effets des AGPI oxydés et de leurs produits d'oxydation sur les cellules intestinales ont été peu étudiés jusqu'à présent. Les hydroperoxydes (LOOH) provenant de l'oxydation des huiles provoquent une altération de la balance redox cellulaire avec un faible rapport GSH/GSSG (forme réduite/forme oxydée) aboutissant à l'apoptose (Wang, Gotoh et al. 2000). Cependant, Wingler *et al.* ont mis en évidence l'effet antioxydant de la protéine GI-GPx dans les cellules Caco-2. Cette protéine prévient le transport des hydroperoxydes (1,3-HPODE) au niveau de ce modèle de barrière intestinale comme l'a montré l'absence d'hydroperoxydes détectables au niveau basal (Wingler, Muller et al. 2000).

Une étude récente a pu montrer qu'un traitement des cellules Caco-2 avec des huiles oxydées (huile de poisson et linoléate de méthyle) à plusieurs temps et avec de 4-HNE (50 μ M) réduit la viabilité cellulaire, induit l'apoptose et soumet ces cellules au stress oxydant en y augmentant le taux de la peroxydation lipidique (Alghazeer, Gao et al. 2008).

Du point de vue des produits secondaires d'oxydation, lorsque des aldéhydes issus de l'oxydation de l'acide linoléique sont administrés par voie orale chez le rat, une lente absorption intestinale et une accumulation dans le foie de différents produits d'oxydation dont le 4-HNE ont été observées (Kanazawa and Ashida 1998a; Kanazawa and Ashida 1998b). Très récemment, Kang *et al.* ont montré chez le rat qu'une administration orale de 4-HNE (0,5 mg 4-HNE/kg de poids corporel/jour) pendant 28 jours aboutit à une toxicité hépatique et rénale (Kang, Kim et al. 2011). De plus, Kasai et al ont évalué la génotoxicité de 4-oxo-2-hexéanal (4-OHE, 3mg/kg), produit mutagène de l'oxydation des AGPI *n*-3 après son administration orale par les souris. Cette équipe a détecté des adduits ADN-4-OHE dans l'œsophage, l'estomac et l'intestin (Kasai and Kawai 2008) (**Tableau 4**). Cependant, les effets métaboliques de l'ingestion de 4-HNE, produit final d'oxydation des AGPI *n*-3, restent encore à étudier.

D'une façon générale, l'administration aux rongeurs de régimes alimentaires à base d'huiles oxydées provoque le développement de pathologies variées telles que des atteintes cellulaires de différents organes, une augmentation du poids des reins et du foie et une modification de la composition en acides gras des tissus adipeux. L'administration de vitamine E peut dans certains cas, contrecarrer ces effets (Chiang, Shaw et al. 2011). Les antioxydants présents dans le régime alimentaire peuvent donc contribuer à limiter les dommages causés par l'ingestion de lipides oxydés.

Nature	Modèle d'étude	Mode d'administration	Conséquences	Référence
AG hydroxylés (HODE)	Homme	Repas	Détection de HODE dans les chylomicrons	Wilson et al. 2002
Hydroperoxydes	Homme	Repas	Détection des hydroperoxydes dans la circulation sanguine	Ursini et al. 1998
Hydroperoxydes d'acide linoléique	Rats	Administration orale	-Lente absorption intestinale -Accumulation dans le foie -Détection d'héxanal et 4-HNE	Kanazawa et al. 1998
Hydroperoxydes (LOOH)	Caco-2	Incubation (24 h)	Déplétion du système redox	Wang et al. 2000
Linoléate de méthyle	Caco-2	Incubation (72 h)	↓ viabilité cellulaire ↑ apoptose	Alghazeer et al. 2008
4-oxo-2-hexéanal (4-OHE)	Souris	Gavage (3 mg/kg)	Détection des adduits ADN-OHE dans l'appareil digestif	Kasai et al. 2008
4-HNE	Rats	Gavage (0,5 mg/kg)	Toxicité hépatique et rénale	Kang et al. 2011

Tableau 4: Etudes traitant de conséquences de la consommation d'AGPI oxydés sur l'organisme.

IV.5. Impact possible des 4-hydroxy-alkénals sur le stress oxydant métabolique

Le stress oxydant, en induisant une peroxydation lipidique des AGPI de la série *n*-3 et *n*-6, entraîne une formation accrue d'hydroperoxydes qui sont très instables et qui se dégradent pour former des aldéhydes très réactifs. Ces derniers pourraient rompre l'équilibre redox intracellulaire, conduisant à la progression du stress oxydant. Certains travaux *in vitro* ont montré que la production intracellulaire de radicaux oxygénés très réactifs augmente en réponse au 4-HNE. Cet effet pro-oxydant du 4-HNE est observé ainsi sur différentes lignées cellulaires (Uchida, Shiraishi et al. 1999).

In vivo chez l'Homme, le taux de 4-HNE dans le sang, les muscles et les cellules adipeuses est plus élevé chez les sujets obèses que chez les sujets sains (Russell, Gastaldi et al. 2003). En revanche, aucune donnée n'est disponible concernant le taux de 4-HNE en cas d'obésité car il est très peu étudié. Globalement, les 4-hydroxy-alkénals peuvent altérer la fonction des protéines qui jouent un rôle important dans l'anabolisme des lipides et la suppression de l'inflammation dans le tissu adipeux du fait de la formation des adduits de Michael par le 4-HNE et le 4-HHE

(Zarrouki, Soares et al. 2007; Pillon, Vella et al. 2011). Très récemment, quelques études *in vitro* sur les adipocytes 3T3-L1 et les cellules musculaires ont pu mettre en évidence l'altération de la voie de signalisation de l'insuline et l'inhibition de la fonction biologique de l'insuline par les 4-hydroxy-alkénals. Ceci suggère une relation entre les 4-hydroxy-alkénals qui peuvent être d'origine exogène, provenant de l'alimentation, ou endogène, due au stress oxydant cellulaire, et l'apparition du syndrome métabolique et de l'insulino-résistance (Demozay, Mas et al. 2008; Pillon, Vella et al. 2011). De plus, il est intéressant de se poser la question de l'impact métabolique de ces 2 molécules sur notre système gastro-intestinal lorsqu'elles sont présentes dans notre alimentation.

Objectifs de thèse

Les recommandations nutritionnelles actuelles portent notamment sur la nécessité d'augmenter la part relative des acides gras insaturés, et plus particulièrement des acides gras de la série *n-3* dans l'alimentation. Cependant, les AGPI sont susceptibles de s'oxyder et de former des aldéhydes toxiques, tels que le 4-HHE et le 4-HNE provenant de l'oxydation des séries *n-3* et *n-6* respectivement. Ces aldéhydes sont reconnus pour avoir des effets délétères sur de nombreux systèmes cellulaires. A l'heure actuelle, aucune étude n'a été menée sur l'absorption intestinale de ces produits après consommation et sur leurs effets métaboliques, plus particulièrement sur la génération de stress oxydant et de l'inflammation.

Afin de mieux élucider les effets des AGPI à longue chaîne (LC) et de leurs produits d'oxydation sur la santé, l'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de la consommation d'AGPI-LC *n-3* sur le stress oxydant et l'inflammation, en se plaçant dans différentes situations d'apports alimentaires observées en pratique : (i) AGPI *n-3* véhiculés soit sous forme de triglycérides (TG) soit sous forme de phospholipides (PL) et (ii) sans induction d'oxydation ou modérément. Pour cela, nous avons étudié :

1. Dans le cadre d'un régime hyperlipidique, les effets métaboliques réputés bénéfiques d'AGPI *n-3* et l'impact de leur vecteur, TG ou PL, sur ces effets.
2. Dans le cadre d'un régime hyperlipidique, les modifications des effets des AGPI *n-3* lorsqu'ils sont oxydés par rapport à la forme non oxydée et l'implication possible de du 4-HHE, produit final d'oxydation des AGPI *n-3*, notamment par son absorption intestinale.

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués nous avons étudié *in vitro*, sur les cellules intestinales humaines Caco-2/TC7, (i) si l'incubation de cellules avec du 4-HHE ou du 4-HNE, avec ou sans micelles lipidiques mixtes au pôle apical, entraînait une présence de ces produits dans le compartiment basolatéral et (ii) si la présence de 4-HHE ou de 4-HNE au pôle apical des cellules intestinales entraînait un stress oxydant cellulaire et/ou une inflammation (**Figure 19**).

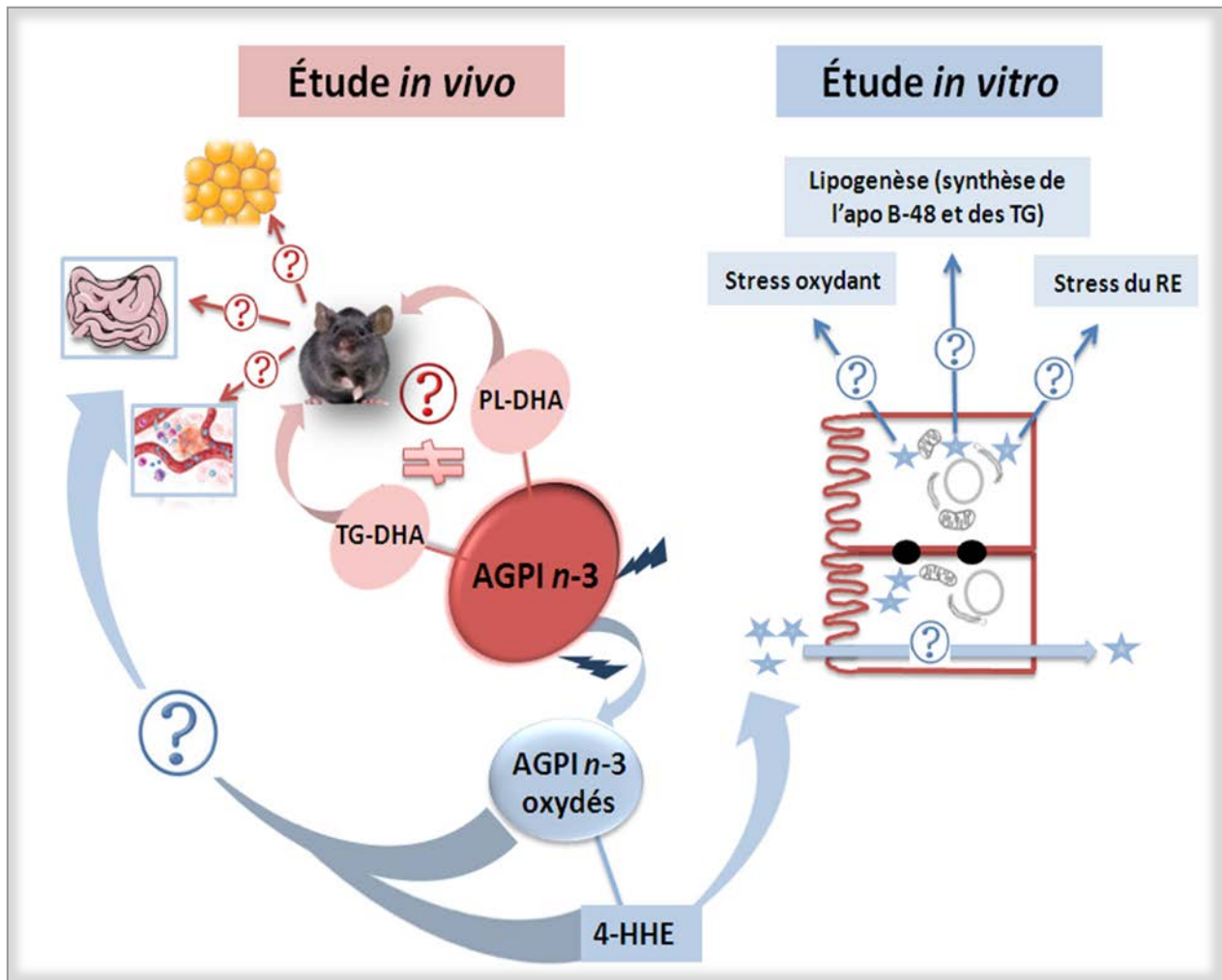


Figure 19: Schéma décrivant la problématique de cette étude. AGPI : acides gras polyinsaturés ; 4-HHE : 4-hydroxy-hexéanal; Apo B-48 : apolipoprotéine B-48 ; TG : triglycérides ; RE : réticulum endoplasmique

CHAPITRE II

Matériels & Méthodes

I. Matériels

Les 4-HHE, 4-HNE et les standards internes deutérés ont été synthétisés par notre équipe selon Soulère et *al.* (Soulere, Queneau et al. 2007). L'huile de thon 25 DHA-flavorless Omegavie®, comme une source des TG riche en AGPI-LC *n*-3 (groupes TG), la lécithine riche en phospholipides (groupes PL) et l'huile de kiwi ont été fournies par Polaris (Pleuven, France). Les saindoux ont été fournis par Celys (Rezé, France), l'huile de tournesol a été fournie par Lesieur® (Asnières-sur-Seine, France) et l'huile de tournesol oléique a été fournie par Olvéa (Marseille, France). La lécithine végétale riche en acide linoléique 18:2 *n*-6 (PL-LA) a été fournie par Lipoid (Frigenstrasse, Germany).

II. Protocole animal

II.1. Animaux et régimes

Des souris mâles C57BL/6J (Janvier, Le Genest St Isle, France) âgées de 8 semaines et pesant 18-20 g à leur arrivée au laboratoire, ont été hébergées dans une pièce convenablement aérée, à température contrôlée ($24\pm 1^\circ\text{C}$), humidité relative ($50\pm 20\%$), ventilée et soumise à un cycle de 12 heures de lumière suivies de 12 heures d'obscurité. Les animaux ont été mis en cage à raison de 5 par cage. Ils ont bénéficié d'un accès libre à la nourriture et à l'eau (à volonté). Après 2 semaines d'acclimatation, les souris ont été divisées en 6 groupes de 8 à 12 souris et nourries pendant 8 semaines avec :

- Un régime maigre contenant 5% de lipides (low fat « LF »).
- Un régime « high-fat » contenant 20% de lipides (HF).
- Un régime HF contenant des AGPI-LC *n*-3 portés par les PL (PL)
- Un régime HF contenant des AGPI-LC *n*-3 oxydés et porté par les PL (PL-ox).
- Un régime HF contenant des AGPI-LC *n*-3 portés par les TG (TG)
- Un régime HF contenant des AGPI-LC *n*-3 oxydés et portés par les TG (TG-ox).

La nourriture a été renouvelée deux fois par semaine, la boisson a été renouvelée chaque semaine. Tous les protocoles expérimentaux ont été accordés par le ministère de l'agriculture français et l'agence vétérinaire départementale du Rhône. Tous les animaux ont été traités au

sein de l'animalerie INSA de l'unité INSERM U1060 en accord avec les réglementations accordés par l'ECC («European Communities Council», 24 novembre 1986, 02/889/ ECC).

A l'issue des 8 semaines de régimes, les souris ont été sacrifiées. Les animaux ont été euthanasiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (CEVA Santé Animale, Libourne) (35 mg/kg). Du sang a ensuite été prélevé par ponction intracardiaque avant d'être centrifugé (5 minutes, 2000 g, 4°C). Le plasma a été aliquoté et stocké à -80°C. Pour le dosage plasmatique des 4-hydroxy-alkénals, 3 pools de 300 µL ont été constitués à partir des échantillons de 3 souris (100 µL/souris) pour chaque groupe. Plusieurs tissus ont été prélevés, pesés et stockés à -80°C dans des tubes eppendorf stérilisés : le foie, le tissu adipeux épидидymaire, le tissu adipeux rétropéritonéal, le duodénum et le jéjunum. Le poids des différents tissus adipeux a servi à estimer la masse grasse des animaux.

II.2. Formulation des mélanges de matières premières lipidiques pour leur incorporation dans les régimes des souris

Les régimes des souris ont été préparés par nos partenaires au sein du laboratoire BIA (Anne Meynier, Claude Genot, INRA, Nantes) dans le cadre du projet AGEKANINOX, après différentes discussions entre nos équipes pour leur mise au point.

1- Pour les régimes riches en AGPI-LC *n*-3 : 4 mélanges lipidiques ont été préparés. Les sources lipidiques et leur proportion ont été choisies et calculées d'une façon à obtenir un profil en AG homogène entre ces groupes. Le taux de DHA envisagé dans les régimes a été fixé à 150mg/100g d'aliment pour suivre les recommandations nutritionnelles, et fourni soit par les phospholipides (régimes PL), soit par les triglycérides (régimes TG)

Les mélanges lipidiques pour les 2 groupes non-oxydés (PL et TG) ont été préparés en mélangeant les quantités de lipides indiquées dans le tableau 1 avec la totalité des saindoux. Des essais préliminaires d'oxydation des mélanges lipidiques ont révélé leur grande stabilité dans le temps vis-à-vis de l'oxydation (pas de modification significative des marqueurs lors de la conservation à 50°C pendant plus de 10 jours). Une nouvelle stratégie a donc été mise en œuvre.

Des mélanges lipidiques ont été préparés avec des quantités réduites de saindoux (3 g vs 18g), puis ces mélanges ont été émulsionnés (30 % p/p) dans de l'eau minérale. Les phospholipides contenus dans les mélanges lipidiques ont servis d'agents émulsifiants.

Les émulsions ont été incubées à 80 °C sous agitation jusqu'à ce que la teneur en tocophérols soit divisée par 2. A ce stade, les émulsions ont été lyophilisées, puis les mélanges lipidiques finaux « oxydés » ont été préparé en ajoutant le saindoux résiduel. La composition des régimes est donnée dans le tableau 1.

HF contenant AGPI <i>n</i>-3 LC:	PL	PL-ox	TG	TG-ox
Ingrédient (g/100g)				
<u>Mélanges lipidiques</u>	20	20	20	20
Parmi lesquels:				
Saindoux	18,10	18,10	18,06	18,06
Huile de tournesol	0,6	0,6	0,2	0,2
Tournesol oléique	0,4	0,4	-	-
Kiwi	0,1	0,1	0,02	0,02
Huile de thon	-	-	0,9	0,9
Phospholipides				
PL-DHA	0,8	0,8	-	-
Lécithine PL-LA	-	-	0,8	0,8
Amidon de maïs	39	39	39	39
Poudre de Caséine	20	20	20	20
Saccharose	10	10	10	10
Cellulose pure	5	5	5	5
Mélange des vitamines	5	5	5	5
Mélange des minéraux	1	1	1	1
Tocopherols ^a	0,099	0,099	0,092	0,084
Energie totale (kJ/g)	18,14	18,14	18,14	18,14
Energie (%) Lipides	41,5	41,5	41,5	41,5
Protéine	15,7	15,7	15,7	15,7
Amidon	34,1	34,1	34,1	34,1

Tableau 1 : Composition de quatre régimes high-fat supplémentés en AGPI *n*-3 oxydés ou non et portés par PL ou TG. a : correspond à la quantité des tocophérols ajoutée lors de la formulation des régimes pour les équilibrer.

2- Pour le régime «LF», dépourvu en AGPI-LC mais dont rapport *n*-6/*n*-3 est conforme aux recommandations nutritionnelles et le régime «HF» qui est riche en lipides et

dépourvu en AGPI-LC *n*-3 : la préparation des 2 mélanges lipidiques a été faite en mélangeant les quantités de lipides indiquées dans le tableau 2 avec la totalité des saindoux.

	LF	HF
Ingrédient (g/100g)		
<u>Mélanges lipidiques</u>	5	20
Parmi lesquels:		
Saindoux	2	18,10
Huile de tournesol	0,64	1,1
Tournesol oléique	1,27	0,0
Kiwi	0,29	0,0
Huile de thon	-	-
Phospholipides		
PL-DHA	-	-
Lécithine PL-LA	0,8	0,8
Amidon de maïs	54	39
Poudre de Caséine	20	20
Saccharose	10	10
Mélange des vitamines	5	5
Mélange des minéraux	1	1
Tocopherols	0,0	0,084
Energie totale (kJ/g)	14,88	18,14
Energie (%)		
Lipides	12,6	41,5
Protéines	19,1	15,7
Amidon	57,6	34,1

Tableau 2 : Composition de deux régimes low fat (LF) et high-fat (HF).

Après formulation et préparation, les mélanges lipidiques ont été conditionnés sous azote, congelés à -20°C et envoyés à la société SAFE.

II.3. Dosages plasmatiques

II.3.1. Dosage par kits ELISA

Les concentrations plasmatiques IL-6 (Ray Biotech), MCP1 (R&D systems), LBP et sCD14 (Alexis) ont été mesurées grâce à l'utilisation de kits ELISA en suivant les instructions décrites dans les manuels des fournisseurs.

II.3.2. Dosage des TG plasmatiques

Les TG plasmatiques ont été dosés en utilisant le kit « Triglycérides PAP » (Biomérieux, France) basé sur des réactions enzymatiques qui consistent à hydrolyser les triglycérides en glycérol et acides gras non estérifiés à l'aide d'une lipase. Le mini dosage a été effectué sur une plaque 96 puits en suivant les instructions du fournisseur. 25 μ L du plasma par échantillon ont été nécessaires au dosage. Une gamme étalon de TG a également été préparée à partir d'un standard de TG à 2,29 mmol/L puis déposée dans les puits. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la densité optique a été lue simultanément à 505 nm sur toute la plaque grâce à un lecteur de plaque.

II.3.3. Dosage des AG libres plasmatiques

Les acides gras non estérifiés ont été quantifiés par dosage enzymatique à l'aide d'un kit NEFA-C (Wako Chemicals, Neuss, Germany) en suivant les instructions du kit. 5 μ L du plasma ont été incubés avec 100 μ L du réactif A pendant 10 minutes à 37°C afin de transformer les acides gras libres en acyl-CoA sous l'action de l'acyl-CoA synthétase. A ce mélange, 200 μ L de réactif B ont été rajoutés et le mélange a ensuite été incubé 10 minutes à 37°C. Les acyl-CoA seront alors oxydés par l'acyl-CoA oxydase pour former du 2,3 trans-enoyl-CoA et de l'eau oxygénée. En présence de peroxydase, l'eau oxygénée libérée conduit à la formation d'un composé coloré. La coloration a été lue au spectromètre à 550 nm.

II.4. Immunohistologie

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec une chercheuse de notre équipe (Pascale Plaisancié). Les duodénums de différents groupes de souris ont été récupérés puis déparaffinés dans deux bains de méthylcyclohexane, réhydratés dans des bains successifs d'alcool de degré décroissant et rincés dans deux bains de PBS (1X) successifs. Les coupes ont ensuite été immergées dans de l'eau oxygénée à 3 % pendant 20 minutes pour inhiber la peroxydase endogène. Les coupes ont ensuite été incubées avec successivement le bloquant des sites antigéniques non spécifiques (ImmPRESS, Anti-cheval), puis avec l'anticorps primaire anti-lysozyme (1/100, Zymed Laboratories) dilué dans du tampon PBS/BSA (2%) pendant 60 minutes. Les coupes ont ensuite été rincées puis incubées avec l'anticorps secondaire spécifique couplé à la peroxydase (ImmPRESS, Vector Laboratories). Après 30 minutes d'incubation, les coupes ont été rincées et le marquage a été révélé avec l'AEC (3-amino-9-ethylcarazole), un substrat de la peroxydase (Vector Laboratories). Après rinçage (PBS puis eau), les coupes ont été contre-colorées par l'hématoxyline et montées sous lamelles à l'aide du fixateur Vectamount (Vector Laboratories).

Quantification des cellules de Paneth

Les cellules de Paneth ont été évaluées en déterminant le nombre moyen de cryptes contenant les cellules de Paneth (par 80 cryptes). Pour cela, 4 à 6 coupes ont été analysées par souris. Une crypte était considérée lorsqu'elle était coupée le long de sa longueur. Toutes les coupes ont été examinées en aveugle.

II.5. Etude de gavage

Des souris C57Bl/6 âgées de six semaines (Janvier, Le Genest St Isle, France), préalablement mises à jeun pendant la nuit, ont été traitées par une simple administration orale de 4-HHE dissous dans du DMSO (0,5%) et dilué dans l'eau (88 $\mu\text{mol/kg}$). Les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (35 mg/kg) et sacrifiées après différents temps de traitements : une heure, deux heures ou quatre heures. Un 4^{ème} groupe des souris à jeun a aussi été sacrifié à T0 sans avoir reçu de 4-HHE pour servir à déterminer les concentrations basales d'4-hydroxy-alkénals plasmatiques. Le sang prélevé par

ponction intracardiaque a été centrifugé (5 minutes à 4°C, 8000 g). Le plasma a ensuite été collecté et stocké à -80°C. Le duodénum et le jéjunum de l'intestin grêle ont été aussi collectés et stockés à -80°C.

III. Protocole cellulaire

III.1. Culture cellulaire

Les cellules TC7, clone sélectionné à partir de la lignée parentale Caco-2 par Monique Rousset (Chantret, Rodolosse et al. 1994), ont été maintenues et cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified eagle's Meduim, Gibco) additionné de 20% (Vol/Vol) de sérum de veau foetal décomplémenté (30 min, 56°C), de 1% de pénicilline /streptomycine et de 1% d'acides aminés non essentiels. Les cellules ont étéensemencées dans une flasque plastique de 75 cm² à une densité de 1x10⁶ cellules/flasque. Elles ont été incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humide contrôlée à 10% de CO₂. Des repiquages ont été réalisés à l'aide d'une solution de trypsine 0,05% EDTA (Gibco), deux fois par semaine lorsque les cellules atteignent 80% de confluence.

Pour les expériences, les cellules ont étéensemencées à une densité de 280,000 cellules par 1,5 ml par insert d'une plaque 6 puits en transwells (Corning, 12 mm de diamètre et 0,4 µm de porosité) pour séparer les deux compartiments apical (AP) et basal (BL) pendant les 21 jours de culture. Jusqu'à la confluence (J6-J7 après l'ensemencement) le même milieu standard est mis en apical et en basolatéral et à partir de la confluence, le milieu apical a été appauvri en sérum pour se rapprocher de l'asymétrie physiologique.

III.2. Incubation des Caco-2/TC7 Avec des 4-hydroxy-alkénals (4-HHE et 4-HNE) seuls ou en présence de micelles mixtes lipidiques

Afin de tester les effets de ces aldéhydes sur les Caco-2/TC7 différenciées (21 jours de culture en filtre ou dans une plaque normale), le milieu de culture a été enlevé et les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS sans Ca et Mg. Les cellules ont été alors incubées pendant différents temps avec du 4-HHE ou du 4-HNE dilué dans du DMSO de façon à obtenir un

volume final de 0,5% de DMSO dans le milieu DMEM au niveau apical, contenant ou non de micelles mixtes lipidiques.

Préparation des micelles lipidiques

Les lipides ont été ajoutés au milieu apical sous forme de micelles mixtes lipidiques dont les compositions en lipides sont décrites comme étant similaires à celles des micelles au niveau duodéal (Chateau, Pauquai et al. 2005). Le mélange d'ingrédients nécessaires à la formation des micelles a été préparé la veille de la manipulation de manière à obtenir comme concentration finale dans le milieu de culture d'incubation : 0,5 mM d'acide oléique ; 0,2 mM de 2-oleoylglycérol ; 0,4 mM de phosphatidylcholine ; 0,2 mM de lysophosphatidylcholine, 0,05 mM du cholestérol et 2 mM de taurocholate (adapté de (Salvini, Charbonnier et al. 2002)). Le mélange de lipides a été ensuite évaporé sous azote et congelé à -20°C. Le jour même de la manipulation, le milieu de culture DMEM sans sérum chauffé à 37°C a été ajouté aux culots lipidiques congelés la veille, puis vortexé 5 minutes. Les micelles lipidiques ont été alors produites en soumettant le milieu à une sonde à ultrasons pendant 10 minutes. Les milieux de culture avec micelles ont été alors conservés à 37°C jusqu'à incubation sur les Caco-2/TC7.

III.3. Mesure des concentrations en 4-hydroxy-alkénals libres dans les milieux d'incubation des cellules

Nous avons choisi de tester les effets de différentes concentrations de 4-HHE et de 4-HNE incubés au niveau apical sur le métabolisme des cellules Caco-2. Comme ces alkénals sont très réactifs, nous devons nous assurer de la concentration finale en forme libre. Nous avons pour cela dosé les 4-hydroxy-alkénals dans le milieu d'incubation, c'est-à-dire DMEM sans sérum foetal mais contenant 1% d'acides aminés non essentiels. Les résultats de GC/MS montrent une diminution importante de la concentration du 4-HNE et du 4-HHE dans le milieu d'incubation par rapport à la concentration introduite au départ. Par exemple, à la concentration de 100 µM, la concentration du 4-HHE libre n'est plus que de 27 µM et celle du 4-HNE n'est que 16 µM. Cette observation est probablement le résultat de la réaction

préalable des 4-hydroxy-alkénals libres dans le milieu avec les acides aminés du milieu, avant toute réaction avec les structures cellulaires.

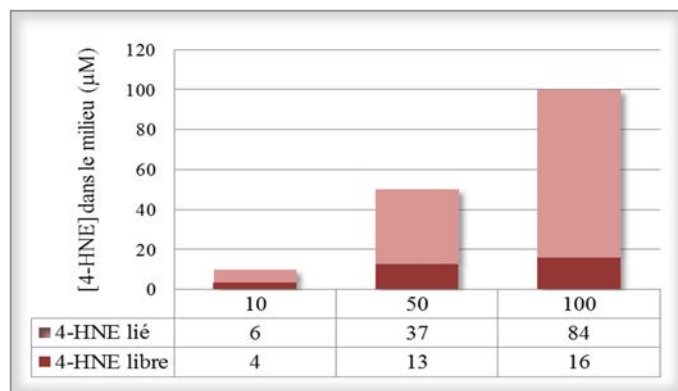


Figure 1 : Dosage de 4-HNE dans le milieu de culture DMEM.

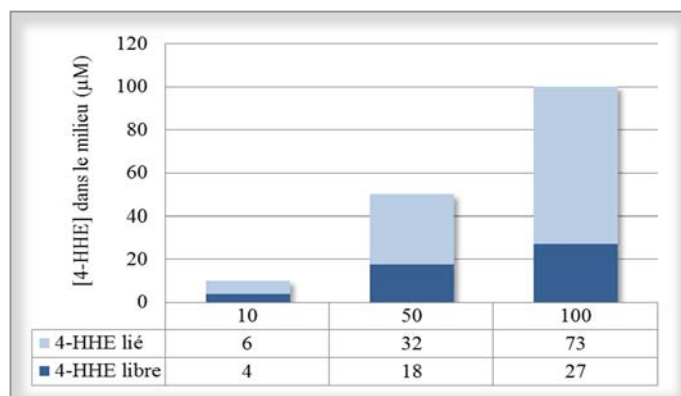


Figure 2 : Dosage de 4-HHE dans le milieu de culture DMEM.

III.4. Mesure de la résistance trans-épithéliale TEER

La perméabilité de la monocouche cellulaire a été testée grâce à la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) qui est le reflet fonctionnel du degré de cohésion entre les cellules ; celui-ci est élevé si les cellules sont jointives. Le principe est de mesurer au moyen d'un résistivimètre (Millicell ERS-2) la résistance au passage d'un faible courant électrique au travers du filtre microporeux sur lequel poussent les cellules. Le résistivimètre est constitué de

deux électrodes : une longue plongeant dans le milieu basolatéral au fond du puits et une autre plus courte placée au niveau du milieu supérieur apical. Le courant passe entre les deux électrodes et l'on mesure la résistance au passage du courant en ohms par insert. La résistivité de la monocouche cellulaire a ensuite été exprimée en Ohm/cm² après soustraction de la résistance intrinsèque du filtre qui ne contient pas de cellules ($100 \pm 8 \Omega \cdot \text{cm}^2$). Seuls les puits présentant un TEER $\geq 250 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ont été utilisés pour réaliser les expériences ultérieures. La chute de la TEER ne doit pas dépasser 20% de la TEER initiale pour considérer la monocouche cellulaire comme toujours intègre.

Après 24 heures de traitement des cellules avec des concentrations croissantes de 4-HHE ou de 4-HNE en présence ou non de micelles mixtes lipidiques, la TEER ne varie pas de manière significative par rapport au contrôle non traité.

III.5. Test de LDH

Cette technique mesure l'intégrité membranaire : les cellules dont la membrane a été rompue libèrent leur contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire, et notamment l'enzyme lactate deshydrogénase (LDH).

La cytotoxicité des aldéhydes a été étudiée à l'aide du kit LDH « Cytotoxicity Detection kit » (Roche Diagnostics) qui mesure l'activité LDH dans le milieu de culture grâce à un dosage enzymatique colorimétrique (Decker and Lohmann-Matthes 1988) en passant par 2 étapes. La LDH transforme le lactate en pyruvate, en réduisant le NAD^+ en NADH. En présence de NADH, le colorant jaune INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium) est transformé en formazan de couleur rouge.

Pour réaliser ce test, les cellules ont été traitées ou non par les deux aldéhydes à différentes concentrations durant 24 heures. A la fin du traitement, 100 μL de surnageant ont été récupérés et transférés dans une nouvelle plaque de 96 puits. Les cellules ont été ensuite complètement lysées par 1% Triton X-100 puis 100 μL de milieu ont été transférés dans une autre plaque 96 puits qui permet de mesurer l'activité de LDH totale. Ensuite, 100 μL de réactif composé de NAD^+ , du catalyseur, du sel de tétrazolium et du lactate de sodium ont été rajoutés. La plaque a été mise à incubation 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité.

L'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 490 nm et de 690 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Le pourcentage de cytotoxicité a été calculé en fonction des activités LDH des surnageants de culture des cellules exposées aux différentes concentrations des molécules à tester, des cellules non traitées et des cellules traitées au Triton X-100 à 1% pendant 30 minutes selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = \frac{(\text{LDH échantillon} - \text{LDH contrôle})}{(\text{LDH Triton} - \text{LDH contrôle})} \times 100$$

Après 24 heures de traitement des cellules avec des concentrations croissantes de 4-HHE ou de 4-HNE en présence ou non de micelles mixtes lipidiques, nous n'avons pas observé de variabilité dans la libération de LDH : Les 4-hydroxy-alkénals n'exercent donc pas d'effet cytotoxique sur la membrane plasmique.

III.6. Carbonylation des protéines

Le niveau d'oxydation des protéines dans les cellules Caco-2/TC7 a été évalué à l'aide du kit oxyblot «Oxidized Protein Detection» (Chemicon ; Hampshire, UK) en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, les cellules après 24 heures d'incubation avec le 4-HHE ou le 4-HNE ont été lysés dans un tampon RIPA contenant 50 mM de Dithiothreitol (DTT) pour éviter l'oxydation des protéines durant la dérivation. Les échantillons ont ensuite été traités à la DNPH (2,4-dinitrophénylhydrazine) qui se lie aux groupements carbonyles sous la forme DNP (2,4-dinitrophénylhydrazone). Un Western blot standard a ainsi été réalisé : les échantillons ont été séparés par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE à 10%, puis transférés sur membrane de PVDF. Après transfert, la membrane a été incubée avec l'anticorps anti-DNP toute la nuit à 4°C. Suite à l'incubation, la révélation des complexes DNP et la détection chimioluminescence ont été faites grâce au kit «WesternBreeze Chemiluminescent» (Invitrogen). La visualisation du marquage a été réalisée grâce à l'utilisation d'une caméra (Image Master VSD-CL ®, Amersham pharmacia biotech).

L'intensité de chaque ligne a été quantifiée grâce au logiciel Quantity One (Bio-Rad) et normalisée par rapport à la moyenne de l'intensité des contrôles non traités avec les 4-hydroxy-alkénals.

III.7. Production d'espèces radicalaires de l'oxygène

Les cellules ont été cultivées dans une plaques 6 puits pendant 21 jours puis elles ont été mises à jeun la veille de traitement. Après 24 heures, les cellules ont été pré-traitées 30 minutes avec 10 μ M final de sonde fluorescente dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2 -DCFDA), dissoute dans du DMSO. Après un rinçage dans du PBS, les cellules ont été incubées en présence de 4-HHE ou de 4-HNE dans du milieu de culture DMEM sans rouge de phénol à différentes périodes. Après traitement, les cellules ont été lysées dans 1,8 ml de Triton 1x100 et conservées à 4°C dans l'obscurité. La production de ROS a été mesurée par un spectrofluorimètre avec des spectres excitation/émission à 495/529 nm respectivement. Les résultats ont été normalisés par la concentration de protéines déterminée par un dosage de Bradford.

III.8. Dosage des triglycérides dans le milieu basolatéral

Les triglycérides ont été quantifiés à l'aide d'un kit de quantification spécifique pour son seuil de détection sensible (BioVision, CliniSciences, France) en suivant les instructions du fournisseur. Les triglycérides ont été clivés par une lipase pour libérer les glycérols et les acides. Les glycérols ont été oxydés par un mélange d'enzymes afin de former un produit réagissant avec une sonde pour générer une émission de lumière. La densité optique a ensuite été lue simultanément à 570 nm sur toute la plaque grâce à un lecteur de plaque.

III.9. Microscopie électronique

Les cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées soit (i) en plaques 6 puits pendant 21 jours puis incubées pendant 30 minutes ou 2 heures avec 100 μ M de 4-HHE ou de 4-HNE, soit (ii) en plaques en transwells pendant 21 jours puis incubées pendant 24 heures avec des micelles lipidiques contenant 100 μ M de 4-HHE ou de 4-HNE. Du glutaraldéhyde 4% a ensuite été

ajouté v/v au milieu de culture pendant 15 minutes puis remplacé par un mélange de cacodylate (0,2M ; pH 7,4) et de glutaraldéhyde 4% (v/v). Après incubation pendant 30 minutes à 4°C, les cellules ont été apportées au Centre Commun d'imagerie de Laennec 1 pour analyse en microscopie électronique à transmission. Brièvement, les échantillons ont été rincés trois fois dans une solution v/v de cacodylate (0,2 M pH 7.4) et saccharose (0,4 M). Les cellules ont alors été incubées 45 minutes dans un mélange v/v d'osmium 2% et de cacodylate (0,3 M pH 7.4). Après un rinçage dans l'eau stérile, les cellules ont été déshydratées par passages successifs dans des solutions d'éthanol (30°, 50°, 70°C et 95°C). Les cellules ont ensuite été raclées et transférées dans un tube où elles subissent 3 bains de 15 minutes dans de l'éthanol 100°. Elles ont ensuite été coupées au microtome et analysées.

III.10. Mesure du diamètre hydrodynamique des chylomicrons

Le diamètre hydrodynamique des chylomicrons sécrétés par les Caco-2 a été mesuré par granulométrie laser à diffusion dynamique de la lumière sur un appareil Zetasizer NanoS (Malvern, Grande-Bretagne). Il s'agit de granulométrie par diffusion de lumière (Dynamic Light Scattering) aussi appelée spectroscopie de corrélation de photons (Photon Correlation Spectroscopy). Cette technique permet de mesurer le diamètre hydrodynamique de particules submicroniques. Le diamètre hydrodynamique correspond au diamètre des particules incluant l'épaisseur de la couche de solvation. Ce type de mesure granulométrique repose sur le principe que toute particule illuminée par une source de lumière, telle qu'un laser, diffuse cette lumière. De plus une particule submicronique en solution n'est pas stationnaire ; elle est mobile à cause des mouvements browniens, c'est-à-dire que la particule entre en collision de manière aléatoire avec les molécules du liquide qui l'entoure. La vitesse des mouvements browniens est d'ailleurs liée à la taille de la particule. Comme l'intensité de la lumière diffusée par la particule fluctue dans le temps en fonction de son mouvement brownien et donc de son diamètre, le système utilise la mesure de cette fluctuation de l'intensité de lumière laser diffusée pour calculer la taille des particules.

Les échantillons, issus des milieux basolatéraux, ont été au préalable centrifugés à 7000 g pendant quatre heures à 10°C afin de pouvoir collecter les chylomicrons. Suite à la centrifugation, les chylomicrons se retrouvent à la surface à cause de leur moindre densité. Les chylomicrons ont été prélevés au niveau du ménisque à l'aide d'une micropipette.

L'analyse granulométrique a été effectuée à 37°C en tenant compte des propriétés du milieu dispersant DMEM : viscosité (0,84 mPa.s) et indice de réfraction (1,33).

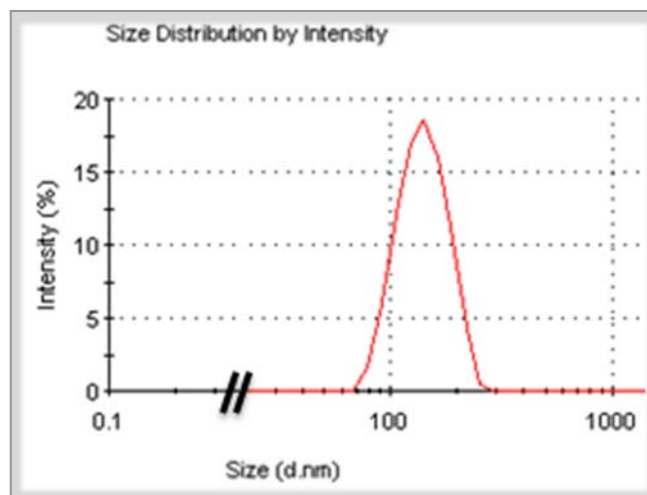


Figure 3 : Exemple d'un résultat montrant la courbe de distribution de taille exprimée en fonction de l'intensité diffusée d'un échantillon de lipoprotéines sécrétées par les cellules Caco-2/TC7.

IV. Analyse des lipides

IV.1. Dosage des 4-hydroxy-alkénals par chromatographie gazeuse couplée à spectrométrie de masse

Cette méthode nous permet de mesurer le 4-HHE et le 4-HNE libres dans le plasma des souris ou dans le milieu basolatéral des cellules incubées avec les 4-hydroxy-alkénals en présence ou non de micelles lipidiques. 20 ng de 4-HHE deutéré (4-HHE-CD3) et de 4-HNE deutéré (4-HNE-CD3) utilisés comme standards internes, ont été ajoutés à 300µL du plasma des souris ou à 400µL du milieu de culture des Caco-2/TC7. L'échantillon a été dérivé par 1mL d'hydrochlorure de pentafluorobenzyl hydroxylamine (PFBHA, HCl) préparé à 50 mM dans un tampon PIPES (0,1 M ; pH=6,5) pendant 30 minutes sous agitation (van Kuijk, Siakotos et al. 1986). Cette réaction convertit les groupements carbonyles en pentafluorobenzoyloximes (O-PFB-oximes).

Les protéines ont été précipitées par 2,5 mL de méthanol et les aldéhydes dérivés sous forme de PFB oximes ont été extraits par 5 mL d'hexane pestipur. L'excès de réactif a été détruit par 60 μ L d'acide sulfurique concentré. Le surnageant récupéré après centrifugation de 5 minutes à 900 g a été évaporé à sec. Le résidu a été traité par 100 μ L de N,o-Bis (Triméthylsilyl) trifluoroacétamide (BSTFA) pendant 24 heures à température ambiante afin de convertir les groupements hydroxylés en triméthylsilyléthers (TMS). Le 4-HHE dérivé sous forme de pentafluorobenzyl oxime, triméthylsilyléther (O-PFB-TMS-4-HHE) et le 4-HNE dérivé sous forme de pentafluorobenzyl oxime, triméthylsilyléther (O-PFB-TMS-4-HNE) ont été mesurés par GC-MS en mode Selective Ion Monitoring (SIM) et ionisation chimique négative (NICI). Chaque standard interne correspond à la molécule native marquée au deutérium avec une masse de 3 g/mol de plus comparé à la molécule non marquée. Cette augmentation engendre une augmentation du rapport masse/charge (m/z) détecté en spectrométrie de masse de 3 unités par rapport au 4-HHE ou 4-HNE ce qui permet de les différencier lors de l'analyse en GC-MS. Pour le 4-HHE, ce sont les ions 241, 271, 291 et 361 qui sont mesurés. Tandis que pour le 4-HHE-CD3 les ions 244, 274, 294 et 364 sont mesurés. En ce qui concerne le 4-HNE, ce sont les ions de rapport masse/charge égal à 283, 313, 333 et 403 qui sont mesurés. Pour le standard 4-HNE-CD3, ce sont les ions ayant un rapport de 286, 316, 336 et 406. L'effet isotopique engendre ainsi pour les molécules deutérées un temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse plus court que pour les molécules non marquées.

IV.2. Analyse des acides gras par chromatographie gazeuse

Ce protocole permet de séparer les acides gras du squelette où ils sont estérifiés, tout en les rendant volatils afin de permettre leur analyse en GC. La réaction chimique de transestérification, en présence d'un catalyseur (le trifluorure de bore, BF_3), permet de rompre la liaison ester pour en former une autre avec un groupement hydroxyméthyle (CH_3OH). 35 μ L du plasma des souris ont été ajoutés à 9 μ L de standard TG (C:17, 2g/L, sigma), 500 μ L de toluène/méthanol (40:60, v/v) et 500 μ L de BF_3 /méthanol (10% dans le méthanol). Les échantillons ont été fermés sous azote et placés dans un bain sec à 100°C pendant 1 heure et 30 minutes (Morrison and Smith, 1964). La réaction a été arrêtée dans la glace 5 minutes puis 1,5 mL de carbonate dipotassique 10% (K_2CO_3) et 2 mL d'isooctane ont été ajoutés. Une centrifugation à 600 g de 10 minutes permet de séparer la phase aqueuse de la phase

organique supérieure. Cette dernière a été récupérée et évaporée sous azote. Les échantillons ont été repris dans 100 μ L d'isooctane pestipur et analysés en GC.

Les molécules dérivées ont été analysées avec un chromatographe HP 6890 équipé d'un injecteur Split/Splitless. L'injecteur, chauffé à 230°C, permet la volatilisation des acides gras qui sont entraînés par l'hélium utilisé comme gaz vecteur. Les acides gras ont été séparés en fonction de leur point d'ébullition et de leur polarité respective sur une colonne capillaire SGE BPX70 de 60 m de long avec un diamètre interne de 0,25 mm. La température initiale du four a été maintenue à 80°C pendant 1,5 minutes puis augmente jusqu'à 245°C par paliers successifs. Les différents composés élués ont été détectés en sortie de colonne grâce à un détecteur à ionisation de flamme (FID) dont la température est fixée à 250°C. Les esters méthyliques d'acides gras ont été identifiés en comparant leur temps de rétention avec celui de leurs standards correspondants connus et injectés dans les mêmes conditions. Les fractions ont été quantifiées grâce au standard interne TG.

V. Mesure de l'expression génique par PCR quantitative en temps réel

V.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN des cellules Caco-2/TC7, de duodénum et de jéjunum des souris ont été extraits à l'aide du kit commercial NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey Nagel, Duren, Allemagne) en suivant les instructions du fournisseur.

Un tampon de lyse (Tampon RLT, fournis dans le kit) et 1% de β -mercaptoéthanol (Sigma #M7154) a été rajouté sur le culot sec des Caco-2/TC7 ou sur le bout de segment de l'intestin des souris. Les échantillons ont été vortexés pendant 10 minutes puis transférés à des colonnes mis sur un tube collecteur pour enlever les débris cellulaires. Les colonnes ont ensuite été centrifugées 1 minutes à 7000 g à température ambiante. Le liquide a été récupéré et mis dans un tube propre contenant de l'éthanol à 70%. Le mélange a ensuite été déposé au milieu d'une colonne d'affinité (membrane de silice) pour les ARN sous laquelle est placé un tube de collection. Suite à une centrifugation d'1 min à 7000 g pendant laquelle l'ARN se fixe à la colonne, deux lavages avec différents tampons fournis dans le kit ont été effectués. L'élution des ARN se fait avec de l'eau « RNase free » que l'on dépose sur la colonne suivie d'une centrifugation. Les ARN récoltés ont été quantifiés par lecture de la densité optique à 260 nm au spectrophotomètre (Nanodrop). Les densités optiques à 230 et 280 nm ont été

mesurées afin d'évaluer les contaminations par les solvants d'extraction et les protéines puis stockés au congélateur à -80°C.

V.2. Transcription inverse (RT)

La rétro-transcription (RT) des ARN totaux en ADN complémentaires (ADNc) a ensuite été réalisée. Les ARN totaux dilués dans l'eau (1µg) ont été dénaturés par chauffage (5 minutes à 65°C). 8 µL de mélange réactionnel de RT ont été ajoutés à la solution d'ARN. Le mélange réactionnel contient : 4µL de tampon (First Strand Buffer, 5X, Invitrogen) ; 2µL de DTT (0,1 M) ; 1µL de dNTP (10 mM, Invitrogen) ; 0,5µL d'oligo dT (0,5µg/µL, Promega) et 0,5µL de random hexamers (0,5µg/µL, Promega). Juste avant le lancement de la RT, 0,5µL de Superscript II (reverse transcriptase, 100U, Invitrogen) et une goutte d'huile ont été ajoutés. Le programme de RT était le suivant : 10 minutes à 25°C, 60 minutes à 42°C et 15 minutes à 70°C. Les produits de RT ont ensuite été dilués au 1/10^{ème} puis traités à la RNase H (5U, NEB) (1µL dans 20µL de produits de RT ; 20 minutes à 37°C) pour supprimer les ARN résiduels.

V.3. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les ADNc de différents gènes à analyser ont ensuite été quantifiés par PCR quantitative en temps réel (qPCR). Dans un rotorgene 6000 (Corbett Research), la réaction de qPCR a été réalisée à partir de 5µL de RT diluée au 60ème, 0,5µL d'amorces sens (15µM) et 0,5µL d'amorces anti-sens (15µM), 10µL d'Absolute qPCR Mix (Abgene) contenant entre autres, les dNTP, la Taq polymérase et le SYBR Green. A l'issue des 40 cycles de qPCR, une courbe de fusion permettant de vérifier la pureté de l'amplification a été générée. Pour chaque gène amplifié, une gamme étalon a été réalisée. Grâce à cette gamme étalon, la concentration d'ADNc a pu être déterminée très précisément pour chaque gène. L'expression des gènes a ensuite été normalisée par rapport à l'expression du gène ménage, HPRT ou TBP.

Les amorces utilisées pour l'amplification de gènes sont récapitulées dans **Annexe 1**.

VI. Expression protéique dans les Caco-2/TC7 et dans l'intestin grêle des souris

VI.1. Extraction des protéines des Caco-2/TC7 et de l'intestin grêle des souris

Les protéines des Caco-2/TC7 ou des duodénums et des jéjunums des souris ont été extraites par 2 protocoles différents selon le type d'analyse ultérieure:

- **Par le kit commercial NucleoSpin® RNA/Protein** (Macherey Nagel, Duren, Allemagne) en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, les lysats de protéines récupérés durant l'extraction des ARN ont été précipités à l'aide d'un tampon fourni par le kit pendant 10 minutes. Le culot obtenu après centrifugation (5 minutes à 7000 g) a ensuite été lavé avec 500 µL de l'éthanol à 50°. Le culot après séchage a été dissout dans un autre tampon puis dénaturé pendant 3 minutes à 95°C. une dernière centrifugation a été réalisée (1 minute à 7000 g) afin d'éliminer les débris protéiques. Les protéines récupérées ont ensuite été dosées à l'aide d'un fluorimètre Qubit (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur.
- **Par le tampon RIPA** : des morceaux de duodénum ou de jéjunum des souris d'environ 50 mg ont été coupés puis placés dans des tubes contenant 300 µL de tampon RIPA. Concernant les cellules Caco-2/TC7, la monocouche a été lavée deux fois avec de PBS à 37°C puis lysée avec 200 µL de tampon RIPA. Les échantillons ont ensuite été passés au sonicateur pendant quelques instants puis vortexés brièvement et enfin centrifugés (15 minutes; 7000 g; 4°C). Le surnageant contenant les protéines a été récupéré dans des tubes eppendorf et stocké à -20°C.

Les protéines ont ensuite été dosées par la méthode Bradford. Les échantillons ont été dilués dans l'eau stérile au 1/30^{ème} pour les duodénums et les jéjunums et au 1/20^{ème} pour les Caco-2/TC7. Le dosage a été réalisé en plaque 96 puits. 10µL des points de la gamme étalon (préparée à partir de BSA à 1 mg/mL) ou 10µL des échantillons dilués ont été déposés dans les puits. 250 µL de réactif Bradford (Sigma, France) ont été ajoutés dans chaque puits avant une incubation de 5 minutes à température ambiante. La densité optique a ensuite été lue dans tous les puits à 595 nm.

VI.2. Extraction des protéines nucléaires et cytoplasmiques des Caco-2/TC7

Les protéines nucléaires et cytoplasmiques ont été extraites à l'aide d'un kit NE-PER® (Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermofisher). Les cellules ont été cultivées sur une plaque de 6 puits. Après 24 heures incubation avec le 4-HHE ou le 4-HNE, les cellules ont été lavées 2 fois avec de PBS, grattées dans 1 mL de PBS et collectées en culot sec après centrifugation (10 minutes, 7000 g, 4°C). Le culot a ensuite été incubé avec le tampon CRE I pendant 10 minutes dans la glace puis avec un autre tampon CRE II. Après centrifugation (5 minutes, 7000 g, 4°C), le surnageant qui contient l'extrait protéique a été transféré dans un autre tube et stocké à -20°C et le culot a été gardé. Le culot contenant les extraits nucléaires a été suspendu dans le tampon NER fourni par le kit puis il a été incubé pendant 40 minutes dans la glace. Suite à l'incubation, le surnageant a été récupéré après centrifugation et stocké à -20°C. Les protéines ont ensuite été dosées par la méthode Bradford comme décrit ci-dessus.

VI.3. Western blotting

Electrophorèse: 30 µg de protéines ont été repris dans un mélange du tampon LSD et du Tampon réducteur 10X (Invitrogen) puis ont été dénaturés par chauffage au bain marie à 70°C pendant 10 minutes. Les échantillons ainsi que les marqueurs de poids moléculaires (Biorad) ont été déposés dans les puits et séparés en fonction de leur poids moléculaires sur un gel Tris-acétate de type SDS-PAGE pour les protéines de haut poids moléculaire (3-8%, Life Technologies, Invitrogen) pendant 1 heure à 150 volts ou sur un gel Bis-Tris acétate pour les protéines de petit poids moléculaire (12%, Life Technologies, Invitrogen) pendant 50 minutes à 200 volts.

Eléctro-transfert: Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de Polyvinylidene Fluoride (PVDF) (Invitrogen) grâce à l'application d'un champ électrique (30 V pendant 1 heure). Après le transfert, les membranes ont été saturées par une solution de blocage contenant des détergents et de la caséine fournis par un kit commercial de révélation (WesternBreeze Chemiluminescent, Invitrogen, France) pendant 1 heure à température ambiante.

Immunodétection et révélation: Après 3 lavages successifs, les membranes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (les différents anticorps primaires utilisés ainsi que les dilutions et les fournisseurs sont récapitulés dans **Annexe 2**). Suite à l'incubation, les membranes ont été lavées puis incubées pendant 30 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-espèce couplé à une peroxydase. Après rinçage des membranes, elles ont été incubées avec un révélateur fourni par le kit pendant 5 minutes. La visualisation du marquage a été réalisée grâce à l'utilisation d'une caméra (Image Master VSD-CL®, Amersham pharmacia biotech). Les bandes ont été quantifiées par densitométrie (Quantity one, Bio Rad, Marne-la-Coquette, France).

VI.4. Dot blotting

50 µg de protéines des Caco-2/TC7 ou de l'intestin grêle des souris ont été déposés directement sur une membrane de nitrocellulose sous forme de spot puis ont été séchés pendant 10 minutes sous une lampe. La membrane a ensuite été bloquée par une solution contenant 5% de BSA (Serum albumin bovine, Sigma, France) dilués dans l'eau pendant 1 heure. Après le blocage, la membrane a été incubée toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires anti-HHE (CosmoBio N213730-EX, Tokyo, Japan) ou anti-HNE (Calbiochem 393207, San Diego, US). Suite à l'incubation, la membrane a été lavée puis incubée pendant 30 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-espèce couplé à une peroxydase. Après rinçage, la membrane a été incubée avec un révélateur fourni par le kit WesternBreeze Chemiluminescent (Invitrogen) pendant 5 minutes. La visualisation du marquage a été réalisée grâce à l'utilisation d'une caméra (Image Master VSD-CL®, Amersham pharmacia biotech). Les spots ont été quantifiés par densitométrie (Quantity one, Bio Rad, Marne-la-Coquette, France).

VII. Statistiques

Les données sont présentées en moyenne \pm SEM et sont analysées à l'aide des logiciels Statview 5.0 (Abacus Concept, Berkeley) et Prism (GraphPad, La Jolla). Pour le protocole animal, les types de test utilisés sont : ANOVA suivie d'un test de Fisher PLSD pour comparer (i) les groupes PL, PL-ox, TG et TG-ox, (ii) les groupes LF, HF, PL et TG, (iii) les

différents paramètres dans l'étude de gavage. ANOVA à deux facteurs (two-way) suivie d'un test de Fisher PLSD est utilisé pour comparer les groupes oxydés vs non oxydé dans l'étude animale (souris des groupes oxydés vs souris des groupes non oxydés). Pour le protocole cellulaire, l'ANOVA a été utilisé dans le cas de comparaisons multiples et le test t de Student non apparié pour des comparaisons entre deux échantillons. Le seuil de significativité choisi est de 5% ($P < 0,05$).

CHAPITRE III: PUBLICATION [1]

*N-3 PUFA added to high-fat diets affect differently
adiposity and inflammation when carried by
phospholipids or triacylglycerols in mice*

Publiée le 15 Février 2013 dans « Nutrition and Metabolism »

Résumé du chapitre III

Les aliments riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne (LC) de la famille *n*-3, notamment l'EPA et le DHA sont reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la santé humaine et plus particulièrement dans la prévention du développement de l'obésité et des maladies cardiovasculaires.

L'EPA et le DHA, sont principalement fournis par les poissons gras, où ils sont majoritairement apportés sous forme des triacylglycerols (TG). Dans l'huile de krill ou les œufs issus de poules supplémentées, la majeure partie de ces AGPI-LC *n*-3 est estérifiée dans les phospholipides (PL). Cependant, la biodisponibilité et l'impact métabolique de ces AGPI pourraient être modulés par la nature chimique des molécules vectrices (TG ou PL). En effet, quelques études ont suggéré un effet potentiellement supérieur des AGPI-LC *n*-3 portés par les PL sur le métabolisme lipidique en comparant avec ceux portés par les TG. Cependant à l'heure actuelle, peu de données sont disponibles pour mettre en évidence si la nature de molécules vectrices des AGPI-LC *n*-3 peut aboutir à une différence d'effets sur le métabolisme cellulaire dans le but de prévenir et de traiter les désordres métaboliques.

Dans ce chapitre, nous avons examiné *in vivo* sur des souris (i) les effets de la consommation à long terme des AGPI-LC *n*-3 sous la forme de TG ou de PL, ajoutés dans un régime hyperlipidique de type occidental (42% de l'énergie en lipides), sur l'adiposité, le stress oxydant et l'inflammation et (ii) si la nature de ces molécules vectrices peut affecter différemment ces paramètres.

Nos résultats ont mis en évidence que les AGPI-LC *n*-3 empêchent l'induction du stress oxydant et de l'inflammation par un régime hyperlipidique. De plus, par rapport aux TG, les PL vecteurs d'AGPI *n*-3 permettent de réduire la taille des adipocytes et de stimuler le système antioxydant.

Les résultats de notre étude appuient les précédentes données soutenant le développement et la consommation d'aliments contenant des AGPI-LC *n*-3. Toutefois, notre étude apporte de nouveaux éléments concernant la manière la plus efficace de véhiculer ces AG pour promouvoir leurs effets métaboliques.

***n*-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice**

Manar Awada,^{1,2} Anne Meynier,³ Christophe O. Soulage,² Lilas Hadji,² Alain Géoën,² Michèle Viau,³ Lucie Ribourg,³ Berengère Benoit,^{2,5} Cyrille Debard,⁴ Michel Guichardant,² Michel Lagarde,² Claude Genot³ and Marie-Caroline Michalski^{*,1,2,5}

¹INRA, U1362, CarMeN, F-69621, Villeurbanne, France ;

²INSA-Lyon, IMBL, F-69621, Villeurbanne, France ;

³INRA, UR1268 BIA, F-44316, Nantes, France;

⁴INSERM U1060, CarMeN, F-69921, Oullins, France;

⁵Université de Lyon, F-69622, Villeurbanne, France.

*Corresponding author, to whom reprints may be requested

INRA U1235, INSERM U1060, Cardiovasculaire Métabolisme diabétologie et Nutrition, CarMeN Laboratory, InFoLip team, Bâtiment IMBL, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE cedex, France

Tel: +33 4 72 43 81 12 - Fax: +33 4 72 43 85 24

E-mail : marie-caroline.michalski@insa-lyon.fr

Abstract

Background: Dietary intake of *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) is primarily recognized to protect against cardiovascular diseases, cognitive dysfunctions and the onset of obesity and associated metabolic disorders. However, some of their properties such as bioavailability can depend on their chemical carriers. The objective of our study was to test the hypothesis that the nature of *n*-3 PUFA carrier results in different metabolic effects related to adiposity, oxidative stress and inflammation.

Methods: 4 groups of C57BL/6 mice were fed for 8 weeks low fat (LF) diet or high-fat (HF, 20%) diets. Two groups of high-fat diets were supplemented with long-chain *n*-3 PUFA either incorporated in the form of phospholipids (HF- ω 3PL) or triacylglycerols (HF- ω 3TG).

Results: Both HF- ω 3PL and HF- ω 3TG diets reduced the plasma concentrations of (i) inflammatory markers such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin 6 (IL-6), (ii) leptin and (iii) 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), a marker of *n*-6 PUFA-derived oxidative stress compared with the control HF diet. Moreover, in both HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups, MCP-1 and IL-6 gene expressions were decreased in epididymal adipose tissue and the mRNA level of gastrointestinal glutathione peroxidase GPx2, an antioxidant enzyme, was decreased in the jejunum compared with the control HF diet. The type of *n*-3 PUFA carrier affected other outcomes. The phospholipid form of *n*-3 PUFA increased the level of tocopherols in epididymal adipose tissue compared with HF- ω 3TG and resulted in smaller adipocytes than the two others HF groups. Adipocytes in the HF- ω 3PL and LF groups were similar in size distribution.

Conclusion: Supplementation of mice diet with long-chain *n*-3 PUFA during long-term consumption of high-fat diets had the same lowering effects on inflammation regardless of triacylglycerol or phospholipid carrier, whereas the location of these fatty acids on a PL carrier had a major effect on decreasing the size of adipocytes that was not observed with the triacylglycerol carrier. Altogether, these results would support the development functional foods containing LC *n*-3 PUFA in the form of PL in order to prevent some deleterious outcomes associated with the development of obesity.

Key words: *n*-3 PUFA; phospholipid; triacylglycerol; high-fat diet; inflammation; oxidative stress; adipose tissue.

I. Background

Chronic inflammation and oxidative stress are recognized as major factors involved in the pathogenesis of several current metabolic diseases such as obesity, type 2 diabetes and cardiovascular diseases (CVD) [1-3]. Elevated levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as interleukins (IL) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), are hallmarks of the metabolic syndrome [1,2]. It is now established that white adipose tissue (WAT) is not only an energy-storage tissue but also an endocrine organ that secretes various bioactive molecules namely “adipokines” including adiponectin, leptin, IL-6 and MCP-1, [4]. These molecules have a key role in the regulation of systemic and energy metabolism. Indeed, dysregulated production of these adipokines due to WAT dysfunction and excess adiposity can contribute to the pathogenesis of obesity and insulin resistance [5]. High-fat intake has been repeatedly shown to play a significant part in the obesity-associated low grade chronic inflammation, which is characterized in human and mice by macrophage infiltration in WAT [6-9].

In this context, dietary supplementation with long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids (LC *n*-3 PUFA), in particular docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 *n*-3) and eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5 *n*-3) presents a variety of health benefits. These LC *n*-3 PUFA are known to be protective by reducing inflammation in both blood and WAT [6,10,11], improving lipid metabolism [12], decreasing risk of CVD [13,14] and several neurodegenerative diseases [15,16]. Therefore, nutritional recommendations of 250 mg/day of EPA/DHA have been established in Western societies for *n*-3 PUFA intake, to achieve nutrient adequacy and lower *n*-6/*n*-3 PUFA ratio [17].

Dietary EPA and DHA are provided mostly by fatty fish, where they are mainly esterified in triacylglycerols (TG). In other sources such as krill, the major proportion of these LC *n*-3 PUFA is esterified in phospholipids (PL). Of note, compared with fish oil, krill oil contains the same amount of DHA but a greater proportion of EPA [18]. The latter is a major precursor of anti-inflammatory eicosanoids [19]. Some authors have compared the potential effects of different LC *n*-3 PUFA formulations on lipid metabolism. The supplementation of LC *n*-3 PUFA in the form of PL would exert superior biological and nutritional functions compared to TG. This would include (i) anti-inflammatory actions [20,21] and antioxidant activities on the brain lipids [22], (ii) improved memory and learning [23], (iii) reduced blood and tissue lipids [24-26], (iv) increased bioavailability of EPA and DHA in plasma [27,28] and (v) tendency to reduce obesity [21]. In humans, the

effects of PL-bound LC *n*-3 PUFA provided by krill oil on plasma lipids were similar to those of TG-bound LC *n*-3 PUFA from fish oil but at lower dose of LC *n*-3 PUFA [27]. In the rodent studies, the amount of LC *n*-3 PUFA in the diets were usually high, i.e. ~ 8–15% of total fats [21,26,29].

To date, available data are insufficient to assess whether the supplementation of Western-type high-fat (HF) diets with LC *n*-3 PUFA carried either by TG or by PL can make any difference in the metabolic outcomes, with an aim to prevent or treat metabolic disorders.

The aim of the present study was to test the hypothesis that long-term intake of nutritional amounts of *n*-3 PUFA in realistic HF diets could exert different effects according to the PL or TG carrier on (i) the development of adiposity and (ii) associated oxidative stress and inflammation.

I. Materials & Methods

II.1. Materials

Omegavie® Tuna oil 25 DHA flavorless was provided by Polaris (Pleuven, France) as a source of triacylglycerol rich in LC *n*-3 fatty acids. A lecithin rich in DHA was enzymatically synthesized by Polaris (Pleuven, France) and further purified by precipitation with cold acetone to eliminate all traces of triacylglycerols and ethyl esters [30]. As shown by HPLC paired with evaporative light-scattering detector and external calibration curves, PL-DHA was composed of lysophosphatidylcholine (lysoPC: 49.2 ± 0.7 wt%), phosphatidylcholine (PC; 33.5 ± 0.4 wt%), phosphatidylinositol (PI; 9.0 ± 0.3 wt%), phosphatidylethanolamine (PE: 4.8 ± 0.7 wt%) and sphingomyelin (3.5 ± 0.2 wt%). Lard was supplied by Celys (Rezé, France) and kiwi seed oil, as additional source of alpha-linolenic acid, by Polaris (Pleuven, France). Sunflower oil (Lesieur®) was purchased from a local supermarket and oleic sunflower oil from Olvéa (Marseille, France). The vegetable lecithin rich in linoleic acid 18:2 *n*-6 (PL-LA) was sold by Lipoid (Ludwigshafen, Germany) and was composed exclusively of phosphatidylcholine and antioxidants (no TAG).

II.2. Preparation of lipid for mice diets

Low fat (LF), HF and the two HF lipid blends containing LC *n*-3 PUFA in the form of PL or TG were prepared at the lab scale. DHA and, in lower amount, EPA were supplied either in the form of triacylglycerols (HF- ω 3TG) or phospholipids (HF- ω 3PL). The fatty acid compositions of both the tuna oil and the lecithin rich DHA product are reported in additional file 1. The four blends were prepared by direct mixing of the different oils and fat sources, including the lard in the proportions indicated in Table 1. Then they were stored under a flux of nitrogen at -20°C and sent to SAFE (Augy, France) for preparing the mice diets. The composition of the four diets is reported Table 1. HF- ω 3TG and HF- ω 3PL are the diets that served as unoxidized *n*-3 diet controls in our other study about the impact of PUFA oxidation [30].

II.3. Animals and diets

Male C57BL/6 mice (8 wk, 20 g) from Janvier SA (Le Genest Saint-Isle, France) were housed in a temperature-controlled room (22°C) with a 12 h light/12 h dark cycles. After 2 weeks of chow diet, mice were randomly divided into four groups fed one of the four following diets for 8 weeks: LF, HF, HF- ω 3TG and HF- ω 3PL diets. Animal experiments were performed under the authorization n°69-266-0501 (Direction Départementale des Services Vétérinaires du Rhône, France). All experiments were carried out in compliance with the French Ministry of Agriculture guidelines (n° 87-848) and the E.U. Council Directive for the Care and Use of Laboratory Animals of November 24th, 1986 (86/609/EEC), in conformity with the Public Health Service (PHS) Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. COS holds a special licence (n° 69266257) to experiment on living vertebrates issued by the French Ministry of Agriculture and Veterinary Service Department. Body weight was measured twice in a week and food intake was measured weekly. After 8 weeks, mice were euthanized by intraperitoneal (IP) injection of sodium pentobarbital and blood was collected by cardiac puncture under pyrogen-free conditions on heparin-containing tubes. Plasma, liver, WAT, muscles, duodenum and jejunum were collected. For analysis of 4-hydroxy-2-alkenals, due to plasma volume constraints, 3 pools of 300 μL obtained from 3 mice (100 μL per mice) were used for each group.

High-fat containing <i>n</i> -3 PUFA as	LF	HF	HF- ω 3PL	HF- ω 3TG
Ingredient (g/100g)				
<u>Lipid mixture</u>	5	20	20	20
Among which:				
Lard	2	18.10	18.10	18.06
Sunflower oil	0.64	1.1	0.6	0.2
Oleic sunflower	1.27	0.0	0.4	-
Kiwi seed oil	0.29	0.0	0.1	0.02
Tuna oil (DHA located in TG)	-	-	-	0.9
Phospholipids				
PL-DHA (DHA located in PL)	-	-	0.8	-
Lecithin PL-LA	0.8	0.8	-	0.8
Corn starch	54	39	39	39
Casein	20	20	20	20
Sucrose	10	10	10	10
Pure cellulose	5	5	5	5
Vitamin mixture	5	5	5	5
Mineral mixture	1	1	1	1
Mineral mixture	0.000	0.084	0.099	0.092
Tocopherols ^a	0.099	0.099	0.092	0.084
Energy content (kJ/g)	14.88	18.14	18.14	18.14
Energy %				
Lipids	12.8	41.5	41.5	41.5
Protein	19.1	15.7	15.7	15.7
Carbohydrates	57.6	34.1	34.1	34.1

Table 1 Formulation of the experimental diets ^aConsidering the difference observed in tocopherols in lipid mixtures, which can affect their metabolic impact [31], care was taken to supplement lipid mixtures with α -tocopherol during formulation to achieve iso-tocopherol diets.

II.4. 4-Hydroxy-2-alkenals: derivatization, analysis and quantification

4-hydroxy-2-alkenals were derivatized from 300 μ l of plasma as described previously [32]. Deuterated 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) (20 ng) used as internal standards were added to the samples. Briefly, they were treated with O-2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl hydroxylamine hydrochloride. After acidification with H₂SO₄,

pentafluorobenzoyloxime derivatives were extracted with methanol and hexane. The hydroxyl group was then converted into trimethylsilylether after an overnight treatment with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide at room temperature. The pentafluorobenzoyloxime trimethylsilylether derivatives of 4-HHE (O-PFB-TMS-4-HHE) and 4-HNE (O-PFB-TMS-4-HNE) were then analyzed by GC-MS using negative ion chemical ionization (NICI) mode on a Hewlett-Packard quadrupole mass spectrometer interfaced [32] with a Hewlett-Packard gas chromatograph (Les Ullis, France). For the determination of 4-hydroxy-2-alkenals in liver, the tissue was firstly minced in liquid nitrogen with PIPES, then centrifuged and the supernatant treated as previously described. Regarding WAT, a protocol has been adapted to the extraction and derivatization of 4-hydroxy-2-alkenals in lipophilic media. Briefly the o-pentafluorobenzyl hydroxylamine was prepared by dilution in hexane containing pure triethylamine leading to the formation of a precipitate, which was removed. Oxime derivatives were then prepared and extracted with hexane. Lipids were removed by solid phase extraction on silica cartridge, and the oxime derivatives were eluted with hexane/diethyl ether (50/50, vol/vol). The second derivatization (silylation) was achieved as previously described. The method allowed the quantification of free 4-HHE and 4-HNE.

II.5. sCD14, LBP, IL-6, MCP-1, leptin, adiponectin, insulin and glucose measurements

MCP-1, IL-6 (Clinisciences, France), sCD14, LBP (Enzo Life Sciences), leptin, adiponectin (SpiBio, Montigny Le Bretonneux, France) and insulin (Crystal Chem Inc., USA) plasma levels were assayed by ELISA kits according to the manufacturer's instructions. Blood glucose levels were measured on animals in mouse-tail blood using a glucometer (Accu-Chek ®, Roche, France).

II.6. Plasma triacylglycerols and NEFA measurements

Plasma triacylglycerols (TAG) were measured with the triglyceride PAP kit (BioMérieux France) as previously described [33]. Plasma TAG concentration was calculated by subtracting the free glycerol in plasma measured with the glycerol UV-method (R-

Biopharm/Boehringer, Mannheim, Germany). Plasma NEFA was measured using NEFA-C kit (Wako Chemicals, Neuss, Germany).

II.7. Fatty acid analysis

Total lipids were extracted from 35 μ L of plasma as described previously [33] and from tissues according to Folch et al. [34]. The organic phase (solvent) was evaporated under N_2 and total fatty acids were transesterified using boron trifluoride in methanol (BF_3 /methanol) and in the presence of heptadecanoic acid (C17:0, Sigma, France) as an internal standard [33]. The FA methyl esters were then analyzed by GC using a DELSI instrument model DI 200 equipped with a fused silica capillary SP-2380 column (60 m x 0.22 mm).

II.8. Quantification of tocopherols

Tocopherols in epididymal WAT (eWAT) and retroperitoneal WAT (rWAT) were quantified without saponification according to a method described by [35]. An aliquot of lipid extract was dried under N_2 , then solubilized in *n*-hexane and analyzed by HPLC paired with a fluorimeter detector ($\lambda_{ex} = 295$ nm and $\lambda_{em} = 330$ nm). Separation of the different isomers of tocopherols and tocotrienols was achieved on a polar column (Acclaim Polar advantage II, Dionex, 3 μ m; 250 x 3 mm) in isocratic mode at 0.5 ml/min with hexane/methyl-terbutyl-ether 90/10, vol/vol. The quantification was realized by comparison of the peak areas with calibration curves performed with external standard solutions of α , γ , β and δ tocopherols (Calbiochem, tocopherol set) and γ tocotrienol (Sigma, France). An aliquot of each diet was saponified for 30 min at 70°C in a mixture containing potassium hydroxide (50% w/vol in water), pyrogallol in ethanol (1% w/vol). Tocopherols were extracted with hexane containing 0.005% (w/vol) of BHT. After centrifugation and washing, the organic phase was mixed. The solvent was removed under vacuum, and then under a stream of nitrogen. Tocopherols were finally dissolved in *n*-hexane and then quantified as described previously.

II.9. Cellularity study: measurement of adipocyte size and number

Preparation of adipose tissue for determination of cell size was performed essentially as described previously [36]. Briefly, 30–40 mg of eWAT or rWAT was immediately fixed in osmium tetroxide for 96 hours at room temperature. After washing, adipose cell-size distribution was then assessed using a Beckman Coulter Multisizer IV (Beckman Coulter) with a 400 μm aperture. The range of cell-sizes that can effectively be measured using this aperture is 20–240 μm . The instrument was set to count 1000 particles per run, and the fixed-cell suspension was diluted so that coincident counting was less than 10%. After collection of pulse sizes, the data were expressed as particle diameters and displayed as histograms of counts against diameter using linear bins and a linear scale for the cell diameter. Cell-size distributions were drawn from measurement of at least 12 000 cell diameters per animal. Mean cell weight was calculated as measured Cell volume \times TG density (0.9); cell number were calculated as Cell weight/WAT mass (eWAT or rWAT).

II.10. Quantitative PCR analysis

Total RNA was extracted from 50 mg of duodenum and jejunum of mice using the NucleoSpin® RNA/Protein kit (Macherey Nagel, Duren, Germany), and from 50 mg of eWAT or rWAT with TRIzol (Invitrogen, Eragny, France). cDNAs were synthesized from 1 μg of total RNA in the presence of 100 units of Superscript II (Invitrogen, France) with a mixture of random hexamers and oligo (dt) primers (Promega, Charbonnières, France). The amount of target mRNAs was measured by RT, followed by real-time PCR, using a Rotor-Gene Q (Qiagen, France). The amount of target mRNAs was measured by RT, followed by real-time PCR, using a Rotor-Gene Q (Qiagen, France). Primer sequence and RT-quantitative PCR conditions are available upon request (cyrille.debard@univ-lyon1.fr). Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mRNA was used to normalize data of duodenum, jejunum and WAT of mice.

II.11. Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM and were analysed using Statview 5.0 software (Abacus Concept, Berkeley). One-way ANOVA followed by Fisher PLSD was used to compare the four groups. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

III. Results

III.1. Diet compositions

Table 2 shows that we succeeded in producing diets equilibrated in terms of *n*-3 PUFA supplies and *n*-6/*n*-3 ratios, with LC *n*-3 PUFA in the form of PL or TG. Importantly, HF- ω 3TG diet, HF diet and LF diet also contained PL in the form of PL-LA lecithin, so that effects of PL- ω 3 can be attributed to the molecular form of LC *n*-3 PUFA in the diet, not to the presence of phospholipids. The HF- ω 3PL diet contained slightly less *n*-3 PUFA than the HF- ω 3TG diet, as frequently found in dietary *n*-3 PUFA sources. In *n*-3 PUFA enriched diets, *n*-3 PUFA contents and *n*-6/*n*-3 ratios were consistent with dietary recommendations, whereas *n*-6/*n*-3 ratio was nearly 15 in HF diet as observed in human Western diets.

FA mg/g Diet	LF	HF	HF- ω 3PL	HF- ω 3TG
SFA	11.3 \pm 1.6	71 \pm 12 ^{\$}	64 \pm 1 ^{\$}	66 \pm 5 ^{\$}
MUFA	24 \pm 6	82 \pm 14 ^{\$}	76 \pm 1 ^{\$}	72 \pm 5 ^{\$}
<i>n</i> -6 PUFA	12 \pm 2	29 \pm 5 ^{\$}	21 \pm 1 ^{\$}	21 \pm 1 ^{\$}
<i>n</i> -3 PUFA	2.1 \pm 0.2	2.0 \pm 0.4	2.8 \pm 0.2 ^{\$*}	3.9 \pm 0.1 ^{\$*}
Among which 18 :3 <i>n</i> -3	2.1 \pm 0.2	2.0 \pm 0.4	2.0 \pm 0.1	1.9 \pm 0.1
20 :5 <i>n</i> -3	-	-	0.2 \pm 0.0 ^{\$*£}	0.4 \pm 0.2 ^{\$*}
22 :6 <i>n</i> -3	-	-	2.8 \pm 0.2 ^{\$*£}	3.9 \pm 0.2 ^{\$*}
Total PUFA	13.8 \pm 2.3	30.4 \pm 5 ^{\$}	23.7 \pm 0.4 ^{\$}	25.0 \pm 1.4 ^{\$}
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 ratio	5.4 \pm 0.4 [*]	14.3 \pm 0.3	7.7 \pm 0.5 [*]	5.4 \pm 0.2 [*]
Total FA	49 \pm 9	184 \pm 31 ^{\$}	163 \pm 2 ^{\$}	162 \pm 11 ^{\$}
α -tocopherol (μ g/g chow)	185 \pm 6	219 \pm 4	201 \pm 1	207 \pm 18

Table 2 Fatty acid composition in the diets (*P < 0.05 vs HF); (^{\$}P < 0.05 vs LF), ([£]P < 0.05 vs HF- ω 3TG). ANOVA followed by Fisher test. Data are mean \pm SEM for n = 3. Abbreviations: FA, fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

III.2. PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet modify biometric parameters

As shown in **Table 3**, the supplementation of HF diets with LC n -3 PUFA decreased the body weight gain in HF- ω 3PL fed mice compared to HF mice but not in HF- ω 3TG mice. Liver weight was significantly lower in mice fed HF- ω 3PL or HF- ω 3TG diets compared to HF group, and even lower than LF group regarding HF- ω 3PL. White adipose tissue weight (total of retroperitoneal, epididymal and subcutaneous adipose tissues) was also lower in HF- ω 3PL group than in HF group but no significant difference was observed between HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups. However, the lean mass estimated by the weight of *gastrocnemius* muscle was not different between the groups (**Table 3**).

Energy intake was evaluated during the 8 weeks of feeding trial. Table 3 shows that it was higher in the three HF groups than in LF group. However, results did not show any difference between HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups. After 8 weeks feeding, free fatty acid and triacylglycerol concentrations were lower ($P < 0.05$) in the plasma of the three groups of mice fed HF diets, regardless of supplementation with n -3 PUFA, than in LF group (**Table 3**). Plasma insulin and glucose levels did not differ among the groups. Neither plasma free fatty acid nor triacylglycerol concentrations were significantly different between the three groups of mice fed HF diets. Hepatic lipid accumulation was similar among groups.

Morphologic parameters	Mice groups according to dietary lipids			
	LF	HF	HF- ω 3PL	HF- ω 3TG
Biometric data				
Initial Body weight (g)	24.1 \pm 0.4	24.2 \pm 0.3	23.9 \pm 0.3	24.5 \pm 0.3
Body weight gain (g)	4.1 \pm 0.1	4.2 \pm 0.5	3.1 \pm 0.1 ^{*\$}	3.7 \pm 0.3
Energy Intake (kJ/mouse/d)	39.1 \pm 0.9	68.9 \pm 0.3 ^{\$}	60.2 \pm 1.3 ^{\$}	59.8 \pm 1.3 ^{\$}
Liver weight (g)	1.39 \pm 0.03	1.36 \pm 0.03	1.21 \pm 0.04 ^{*\$}	1.27 \pm 0.04 [*]
WAT weight (g)	0.84 \pm 0.05	1.03 \pm 0.12	0.72 \pm 0.05 [*]	0.93 \pm 0.11
Gastrocnemius (g)	0.16 \pm 0.0	0.16 \pm 0.0	0.16 \pm 0.0	0.15 \pm 0.0
Plasma lipids				
TAG (mM)	0.89 \pm 0.06	0.66 \pm 0.09 ^{\$}	0.64 \pm 0.04 ^{\$}	0.57 \pm 0.04 ^{\$}
NEFA (mM)	0.62 \pm 0.5	0.35 \pm 0.02 ^{\$}	0.27 \pm 0.01 ^{\$}	0.37 \pm 0.02 ^{\$}
Glucose (mmol/L)	9.1 \pm 0.8	8.6 \pm 0.5	9.4 \pm 0.9	9.2 \pm 0.7
Plasma insulin (pmol/L)	37.0 \pm 6.9	36.8 \pm 3.0	24.5 \pm 3.0	26.5 \pm 4.8
Liver lipids (mg total fatty acids/g tissue)	30.3 \pm 2.9	34.0 \pm 3.0	30.3 \pm 0.6	33.1 \pm 3.7
Lipid peroxidation markers in plasma (nM)				
4-HHE	23.3 \pm 13.5	103.7 \pm 36.5	88.8 \pm 32.0	128.0 \pm 37.5
4-HNE	4.9 \pm 0.3 [*]	13.4 \pm 0.5	5.9 \pm 1.1 [*]	8.6 \pm 0.3 [*]

Table 3 Morphologic parameters, food intake and plasma lipid concentrations of mice (*P < 0.05 vs HF); (^{\$}P < 0.05 vs LF), ANOVA followed by Fisher test. Data are mean \pm SEM for n = 8 per group.

Abbreviations: WAT, white adipose tissue; TAG, plasma triacylglycerols; NEFA, non-esterified fatty acids; 4-HHE, 4-hydroxy-2-hexenal; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal.

For 4-hydroxy-2-alkenals analysis, 3 pools of 300 μ L obtained from 3 mice (100 μ L per mice) were used for each group (n = 3).

III.3. Fatty acid composition in plasma and tissues reflects the enrichment with PL- ω 3 and TG- ω 3 in the high-fat diets

Fatty acid composition of total plasma, liver and WAT were characterized to investigate whether long-term consumption of different diets could change PUFA metabolism. In fact, the profile of total FA in plasma (Table 4), in liver and eWAT (See **additional file 2**) reflected the composition of ingested dietary fats (Table 2). FA profile of rWAT was similar to that of eWAT (See **additional file 3**).

Table 4 shows that the plasma arachidonic acid (20:4 *n*-6), an *n*-6 FA precursor of pro-inflammatory mediators in biological membranes, was significantly higher in HF group than in three other groups. EPA proportion was higher in plasma of mice fed the HF diets supplemented with *n*-3 PUFA compared with HF group, and higher in HF- ω 3TG group than in HF- ω 3PL group. Importantly, plasma DHA was higher in the two HF groups supplemented with LC *n*-3 PUFA in the form of PL or TG compared with LF and HF groups. Additionally, the proportions of LC *n*-3 PUFA (EPA and DHA) were higher in the HF- ω 3TG group than in the HF- ω 3PL group as observed in the diets.

Major FA in plasma				
Total FA (mol/100 mol FA):	LF	HF	HF- ω 3PL	HF- ω 3TG
SFA	33.7 \pm 0.3	34.5 \pm 0.2	34.4 \pm 1.3	36.1 \pm 2.6
16:1 <i>n</i> -7	4.0 \pm 0.5	1.6 \pm 0.2 ^{\$}	1.2 \pm 0.02 ^{\$}	1.6 \pm 0.4 ^{\$}
18:1 <i>n</i> -7	2.7 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1 ^{\$}	1.3 \pm 0.1 ^{\$}	1.4 \pm 0.3 ^{\$}
18:1 <i>n</i> -9	19.3 \pm 1.9	15.6 \pm 0.7 ^{\$}	16.1 \pm 1.9 ^{\$}	13.4 \pm 6.7 ^{\$}
MUFA	27.9 \pm 1.0	19.6 \pm 0.3 ^{\$}	19.5 \pm 0.2 ^{\$}	17.3 \pm 6.7 ^{\$}
18:2 <i>n</i> -6	21.2 \pm 0.6	25.4 \pm 0.2 ^{\$}	26.1 \pm 0.4 ^{\$}	26.4 \pm 0.8 ^{\$}
20:4 <i>n</i> -6	9.6 \pm 1.2 [*]	14.3 \pm 0.4	11.2 \pm 0.5 [*]	9.5 \pm 0.8 [*]
<i>n</i> -6	33.1 \pm 0.9 [*]	42.1 \pm 0.5	39.2 \pm 1.0 ^{\$}	38.2 \pm 3.2 ^{\$*}
18:3 <i>n</i> -3	0.4 \pm 0.1	Tr ^{\$}	0.3 \pm 0.0 ^{*\$}	0.2 \pm 0.0 ^{*\$}
20:5 <i>n</i> -3	0.7 \pm 0.0	Tr ^{\$}	0.7 \pm 0.0 ^{*\$}	1.2 \pm 0.1 ^{*\$}
22:6 <i>n</i> -3	3.8 \pm 0.4	3.2 \pm 0.1	4.9 \pm 0.3 ^{*\$£}	6.6 \pm 0.5 ^{*\$}
<i>n</i> -3	5.2 \pm 0.4	3.9 \pm 0.1 ^{\$}	6.4 \pm 0.2 ^{*£}	8.4 \pm 1.3 ^{*\$}
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 ratio	6.4 \pm 0.3 [*]	10.9 \pm 0.4	6.1 \pm 0.2 [*]	4.6 \pm 0.4 [*]

Table 4 Fatty acid profile in plasma in mice fed different diets (*P < 0.05 vs HF), (^{\$}P < 0.05 vs LF), ([£]P < 0.05 vs HF- ω 3TG). Data are mean \pm SEM for n = 5 per group. Abbreviations: Tr, traces FA; fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

In liver like in eWAT, DHA and EPA levels were significantly increased in both HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups compared to LF and HF groups. A significant difference of LC n -3 PUFA levels was observed between HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups (See **additional file 2**), as observed in the plasma. The n -6/ n -3 ratio, related to a risk of inflammation derived from PUFA metabolites, was higher in mice fed HF diet than the three other groups. This ratio was not different between HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups (**Table 4 and additional file 2**). The relative difference of n -6/ n -3 ratio that existed between the high-fat diets and the LF diet was still observed in plasma and tissues after 8 weeks of diet (**Figure 1**). Altogether, both diets enriched in LC n -3 PUFA resulted in proper accretion of these FA in tissues.

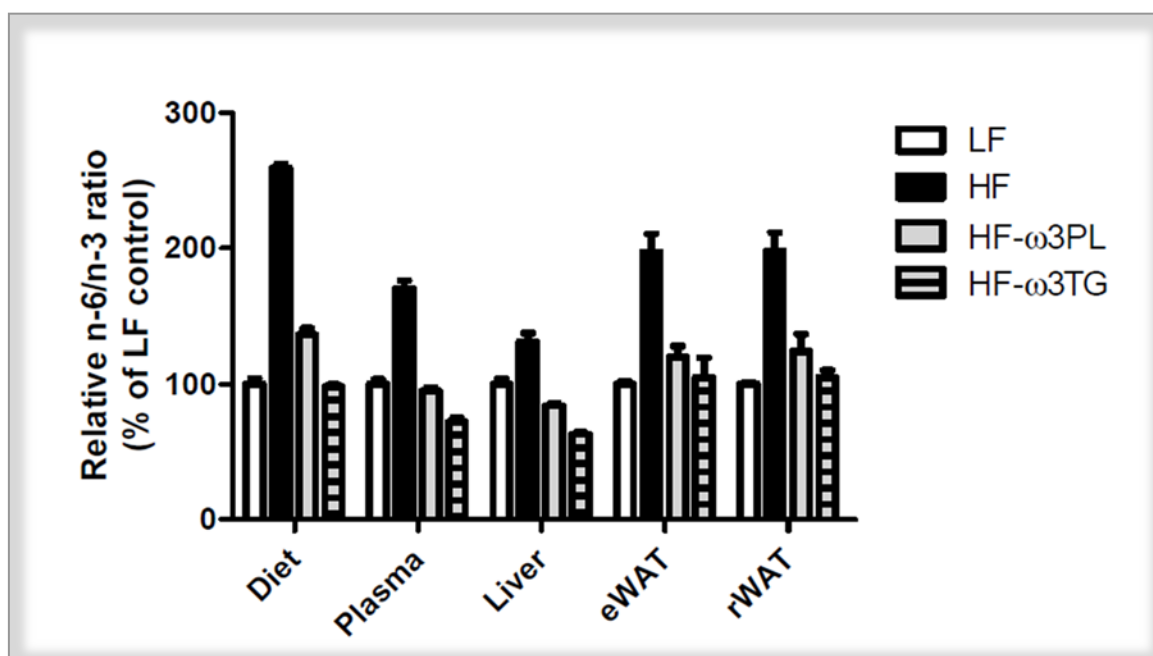


Figure 1. Relative n -6/ n -3 fatty acid ratio in diets, plasma, Liver and WAT. The mice were fed LF, HF, HF- ω 3PL and HF- ω 3TG diets. The values were expressed as percentage of the ratio measured in the groups.

III.4. Effects of PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet on plasma markers of inflammation, metabolic endotoxemia and oxidative stress

High-fat diets are known to induce a metabolic inflammation related to (i) the concentrations of different types of adipokines and (ii) endotoxin transport. Regarding inflammation, we show higher concentrations in plasma of the chemokine MCP-1 (**Figure 2A**) in HF group than in the three other groups. Plasma interleukin IL-6 was also significantly higher in HF group than in HF- ω 3PL group (**Figure 2B**) and tended to be higher in HF group than in HF- ω 3TG mice ($P = 0.06$). Both n -3 diets even resulted in plasma concentrations of inflammatory markers similar to the LF diet. Among plasma markers involved in the transport of the pro-inflammatory endotoxins, the lipopolysaccharide binding protein (LBP) level was higher in plasma of HF mice than in LF and HF- ω 3PL groups (**Figure 2C**). However, no difference was found between HF and HF- ω 3TG groups or between HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups. The plasma level of soluble cluster of differentiation 14 (sCD14), an endotoxin receptor, was also higher in HF mice than in the two HF groups supplemented with LC n -3 PUFA (**Figure 2D**). Regarding adipokines in plasma, results showed an increased leptin concentration in the HF group *vs* all other groups (**Figure 2E**). Supplementation with LC n -3 PUFA in both forms allowed recovering leptin concentrations similar to LF group. In contrast, there was no difference in plasma adiponectin concentration among the groups (**Figure 2F**).

LC PUFA are known to be prone to oxidation because of their high degree of unsaturation. They form oxidized end-products which contribute to oxidative stress. We measured the levels of 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), two markers of lipid peroxidation derived from the oxidation of n -3 PUFA and n -6 PUFA respectively. As shown in Table 3, the plasma level of 4-HHE did not differ among the groups, although there was large variation within groups. The plasma level of 4-HNE was significantly higher in HF group than in the three other groups albeit remaining low (**Table 3**). No differences in 4-HHE and 4-HNE concentrations were observed in the liver that is a major target organ for these alkenals (0.5 to 2 nmol/g regardless of group).

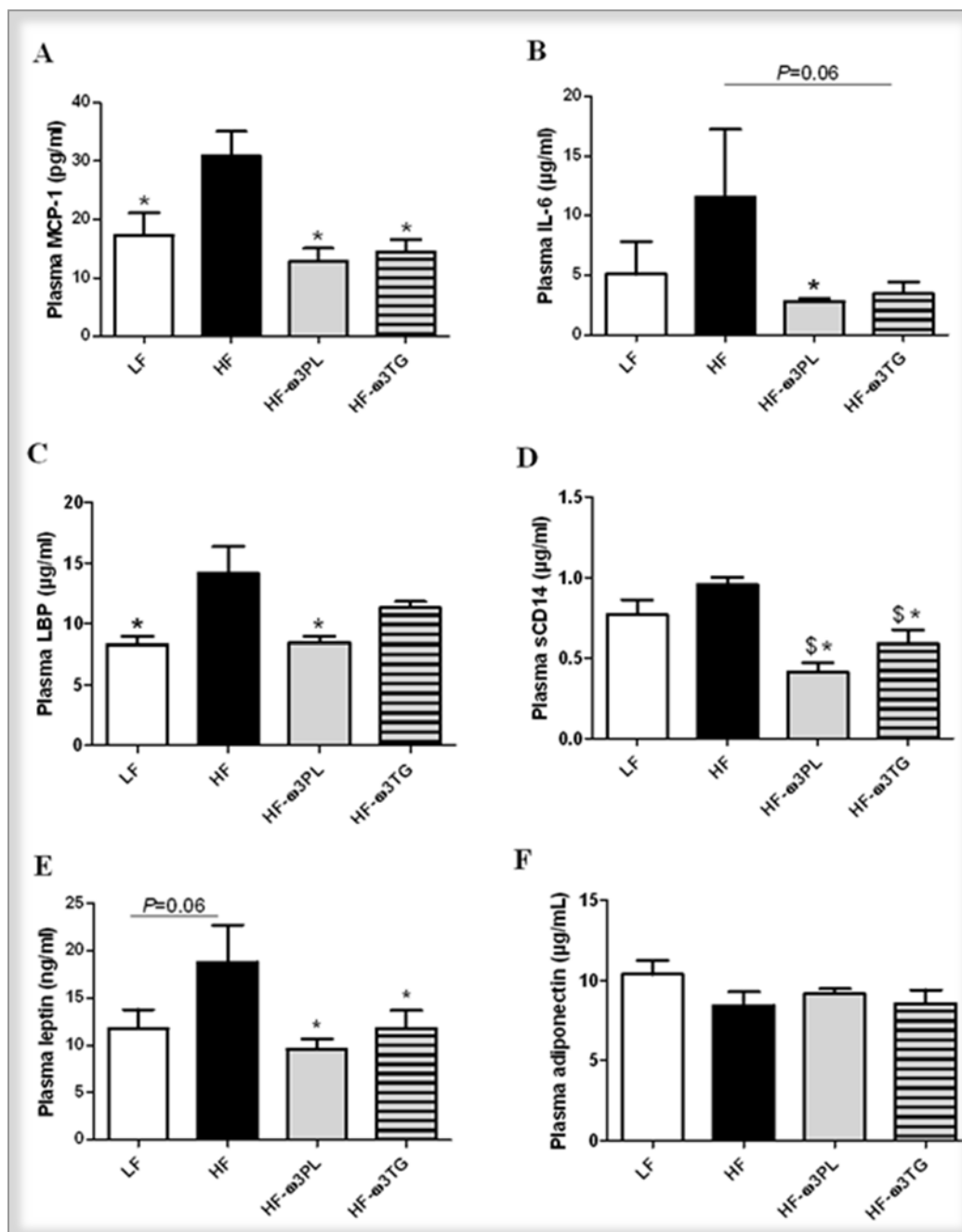


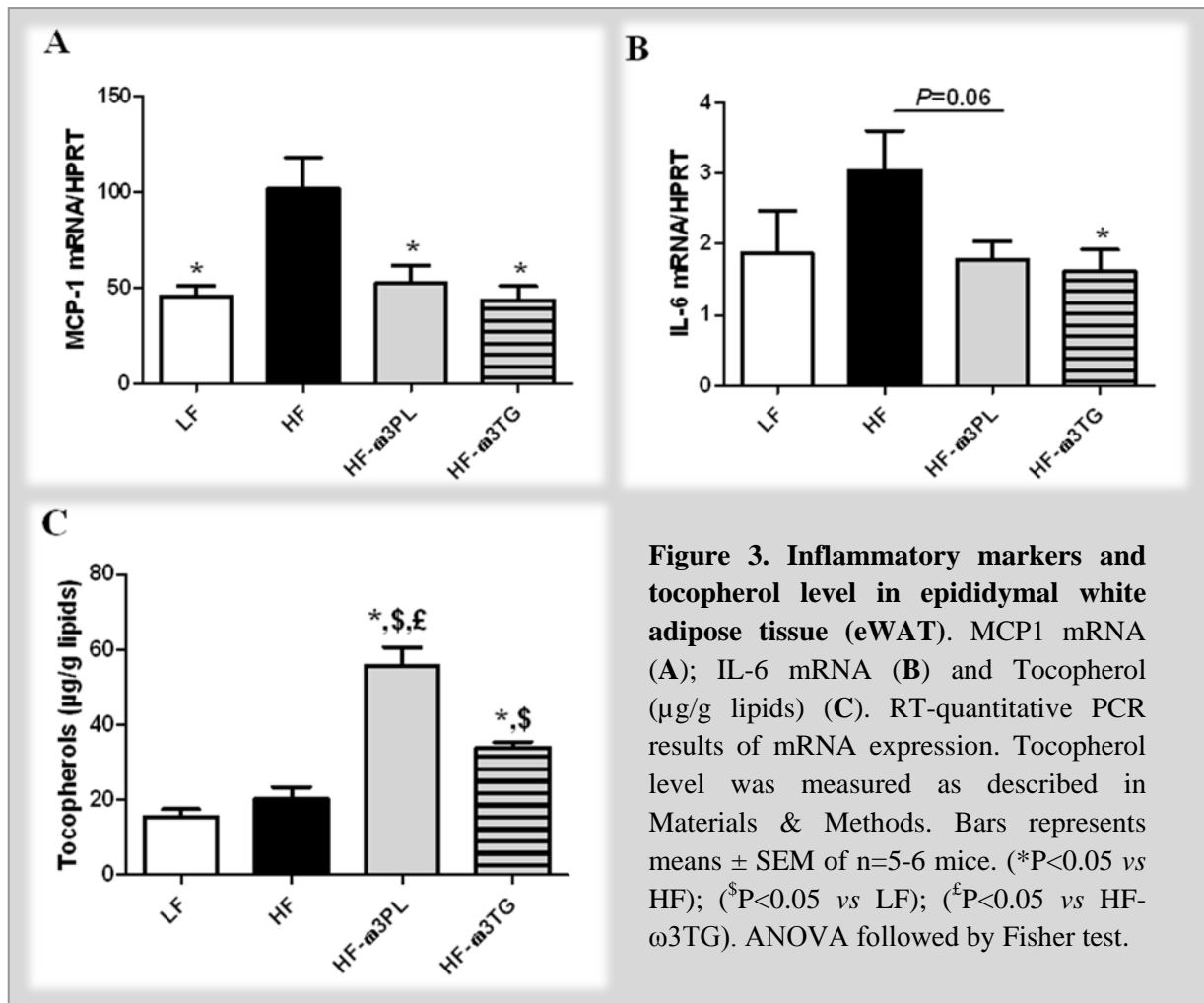
Figure 2. Inflammation and endotoxin metabolism parameters in plasma of mice fed different diets. (A) monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1; pg/ml). (B) Interleukin-6 (IL-6; μ g/ml). (C) lipopolysaccharide binding protein (LBP; μ g/ml). (D) (soluble cluster of differentiation 14 (sCD14; μ g/ml). (E) leptin (ng/ml); (F) Adiponectin (μ g/ml). Data are means \pm SEM (n=6-8). (* P <0.05 vs HF); ($^{\$}$ P <0.05 vs LF). ANOVA followed by Fisher test.

III.5. PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet improve markers related to inflammation and oxidative stress in WAT

Because we noticed a significant decrease of inflammatory markers in the plasma of mice fed HF diet supplemented with LC *n*-3 PUFA, we examined the MCP-1 and IL-6 gene expression in WAT. MCP-1 expression in eWAT was significantly higher in HF group than in the other groups (**Figure 3A**, $P < 0.01$). The same difference between HF and HF- ω 3PL groups was observed in rWAT (see **Additional file 4**). The expression of mRNA IL-6 was significantly decreased in HF- ω 3TG group compared to HF group and tended to be decreased in HF- ω 3PL group compared to HF group (**Figure 3B**). In addition, the level of tocopherols was higher in eWAT of mice fed HF- ω 3PL and HF- ω 3TG diets than LF and HF groups (**Figure 3C**). Noticeably, the level of tocopherols was higher in HF- ω 3PL group than in HF- ω 3TG group ($P < 0.05$) despite the similar levels found in the diets (Table 2). The concentration of the oxidation products 4-HHE and 4-HNE in eWAT and rWAT was similar among groups, in the range 0.5 to 2 nmol per g.

III.6. PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet affect adipocyte size distribution in WAT differently

To know whether the high-fat diets could affect the size and the number of adipocytes in mice, we performed a cellularity analysis of WAT. As shown in **Figure 4**, the size distribution of the epididymal adipocytes in the HF- ω 3PL group showed a marked shift toward smaller sizes compared with HF and HF- ω 3TG groups. The same effect was observed in retroperitoneal fat pads. The cellular characteristics of eWAT in mice fed HF and HF supplemented with LC *n*-3 PUFA in the form of PL or TG are shown in **Table 5**. A reduction of fat accretion in eWAT was observed in HF- ω 3PL group vs HF group but no difference was observed between HF- ω 3TG and the two other groups. Adipocyte sizes in HF- ω 3PL and LF groups were actually similar. This reduction resulted from a decrease in adipose cell volume rather than from a decrease in the total number of adipocytes per fat pad, as calculated from the measured size distribution. Indeed, mean adipocyte diameter was reduced by 14% in HF- ω 3PL group vs HF group ($P < 0.05$) resulting in a 30% decrease in calculated adipose cell volume ($P = 0.03$).



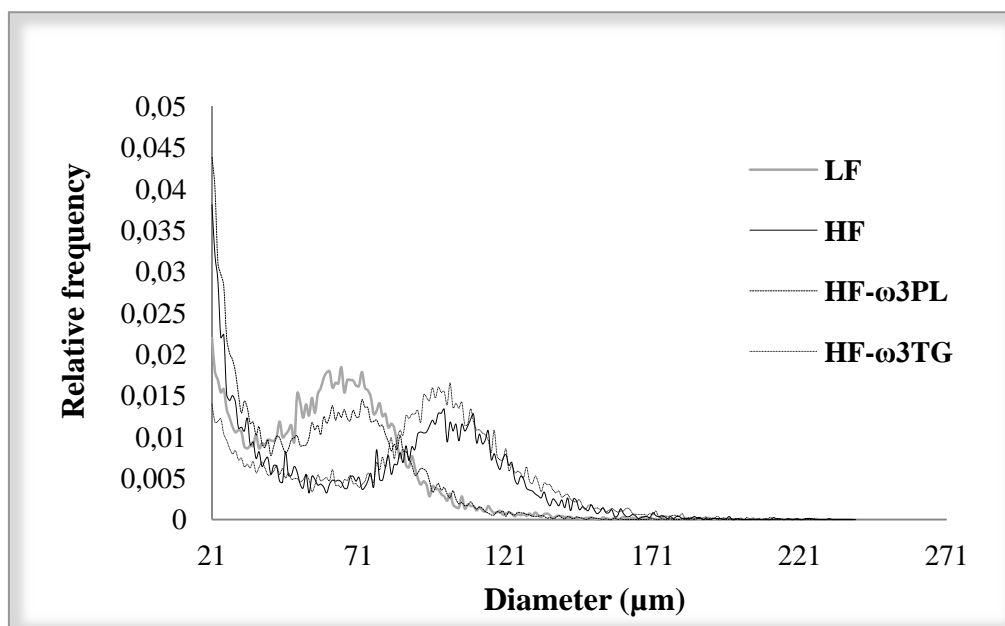


Figure 4. Frequency evolution of adipocyte size of mice in epididymal fat pad. Individual measurements were performed on 12 000-14 000 adipocytes using osmium tetroxide - coulter counter procedure as described in Methods. Note that distribution of adipocyte size was shifted leftward (ie. Towards smaller size) in HF-ω3PL mice compared to HF and HF-ω3TG mice. Value are shown for one representative curve for each group.

	LF	HF	HF-ω3PL	HF-ω3TG
eWAT				
eWAT (mg)	502 ±29	588 ±69	423 ±21 [*]	536 ±59
Mode (μm)	77.3 ±3.9 [*]	89.3 ±6.0	75.6 ±1.8 ^{*£}	84.9 ±5.5
Cell diameter (μm)	67.1 ±3.1 [#]	74.6 ±3.4	64.3 ±3.0 [*]	70.5 ±4.1
Cell weight (ng)	455.5 ±46.5 [#]	619.9 ±49.2	434.8 ±42.9 [*]	496.5 ±99.8
Nb cells (x10 ⁶)	1.19 ±0.01	1.12 ±0.14	1.03 ±0.07	0.99 ±0.07

Table 5 Comparison of adipose cell size variables in eWAT of LF, HF, HF-ω3PL and HF-ω3TG mice

(*P < 0.05 vs HF); (#P = 0.07 vs HF); (£P < 0.05 vs HF-ω3TG).

Data are mean ± SEM for n = 4-5 per group. Abbreviations: eWAT, epididymal white adipose tissue.

III.7. Effect of PL- ω 3 and TG- ω 3 in high-fat diet on oxidative stress in the small intestine

The upper small intestine represents the primary defense line of the organism that can affect metabolism and inflammation. We thus examined the gene expression of gastrointestinal glutathione peroxidase 2 (GPx2), mainly expressed in the small intestine and implicated in the detoxification of lipid oxidation products including 4-HHE and 4-HNE. The expression of GPx2 in the duodenum was higher in HF mice than in LF and HF- ω 3PL groups (**Figure 5A**). In the jejunum, the gene expression of GPx2 was significantly increased in HF group compared with the three other groups (**Figure 5B**).

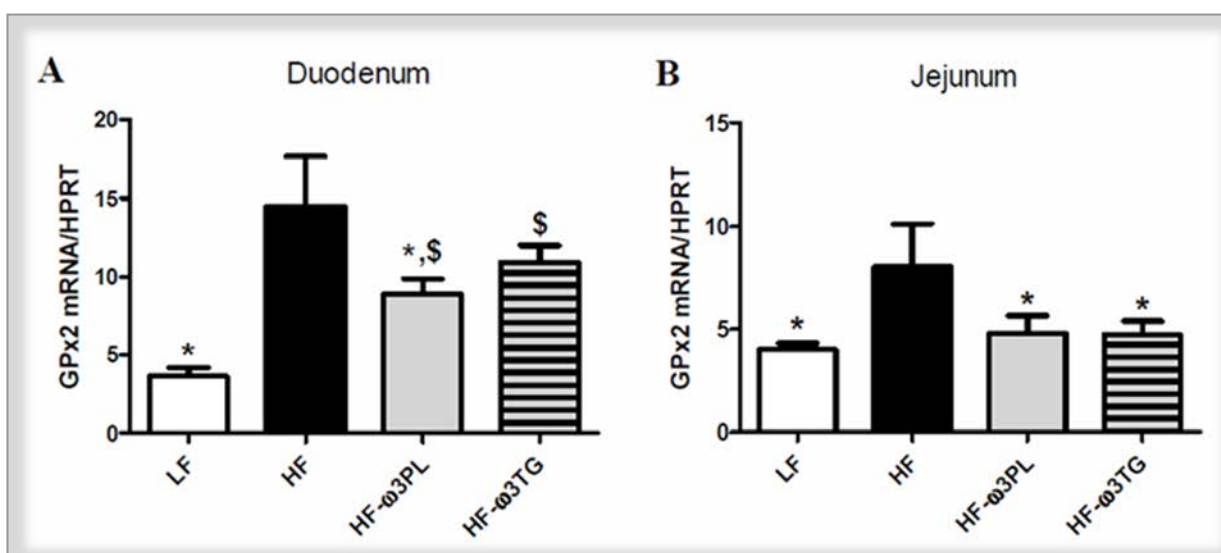


Figure 5. Expression of gastro-intestinal glutathione peroxidase 2 (GPx2) RNA in the small intestine. (A) duodenum and (B) jejunum of mice fed LF, HF, HF- ω 3PL and HF- ω 3TG diets during 8 weeks. This analysis was quantified by qPCR. Bars represents means \pm SEM of n=5-6 mice. (* P <0.05 vs HF); ANOVA followed by Fisher test.

IV. Discussion

In the present study, we investigated (i) the effects of long-term consumption of HF diet supplemented with LC *n*-3 PUFA in the form of PL or TG on adiposity, oxidative stress and inflammation and (ii) whether the PL or TG carrier can affect these parameters. For this purpose, we designed a HF diet containing 20% of fat, rich in saturated fatty acids and with a relatively high *n*-6/*n*-3 ratio to mimic the lipid-enriched foods as consumed in typical Western diets. Importantly, all diets contained the same amount of PL, in the form of PL-DHA in HF- ω 3PL diet and in the form of lecithin PL-LA in all other groups. This formulation ensured that the possible observed effects of PL- ω 3 can be attributed to the location of *n*-3 PUFA in the diet (on PL rather than TG) and not to the presence of polar lipids that would have biased the interpretation.

We show that altogether, long-term intake of HF diet supplemented with LC *n*-3 PUFA protects against inflammation and oxidative stress induced by HF diets. This is in agreement with numerous studies documenting the beneficial health effects of LC *n*-3 PUFA [19,37]. In this study, the supplementation of HF diet with LC *n*-3 PUFA in the PL carrier was slightly lower than that in the TG carrier. Therefore, our results indicate that the effects of LC *n*-3 PUFA from lecithin rich in PL-DHA is more efficient than LC *n*-3 PUFA from tuna oil (mainly TG-DHA). This supports the results of a previous study reporting that in healthy humans the metabolic effects of krill oil (mainly PL) are similar to those of fish oil but at lower dose of LC *n*-3 PUFA [27]. Importantly in previous studies, the PL carrier was provided by the bulk marine sources, i.e. krill oil [25-28]. Usually, the percentage of PL in these products is 40%, which means that a part of *n*-3 PUFA brought by the krill oil was in fact bound to TG carrier in these studies.

In the present study, a dietary intake of LC *n*-3 PUFA during 8 weeks resulted in an increased incorporation of DHA into plasma, liver and WAT lipids, the FA composition of the organs reflecting the fatty acid profiles of the diets. Regardless of the LC *n*-3 PUFA carrier, the *n*-6/*n*-3 ratio in plasma, liver and WAT of mice fed HF- ω 3PL and HF- ω 3TG was lower than in the HF diet. The ratio was almost similar in both HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups, while the HF- ω 3TG group showed a significantly higher proportion of DHA than the HF- ω 3PL group. A decreased *n*-6/*n*-3 ratio in tissues has been reported to reduce atherosclerosis due to the inhibition of systemic and vascular inflammation in apolipoprotein E-deficient mice. The authors attributed these protective effects to the anti-

inflammatory properties of *n*-3 PUFA [38]. In addition, the proportion of EPA in WAT was higher in mice fed the HF diets supplemented with LC *n*-3 PUFA compared with HF, suggesting that the turnover of DHA in eWAT is high. The increase in EPA concentration paralleled the increased level of DHA in HF- ω 3TG more than in HF- ω 3PL.

LC *n*-3 PUFA are known to reduce metabolic inflammation in human and rodents [39-41]. Our data show that the HF diet induced higher IL-6, MCP-1 levels in plasma and in eWAT than LF diet. Interestingly, no activation of these pro-inflammatory markers was observed in HF- ω 3PL and in HF- ω 3TG groups, even if the EPA + DHA dose in the HF- ω 3PL is lower of that in the HF- ω 3TG group. This may indicate that LC *n*-3 PUFA derived from PL provide a better bioavailability and/or bioactivity than those esterified into TG. Our results suggest that LC *n*-3 PUFA, regardless of their molecular form, could inhibit the low-grade inflammation by directly inhibiting macrophage immigration through the inhibition of MCP-1.

Our data are consistent with previous studies reporting that the inflammatory response in WAT induced by HF diet in obese diabetic animals was prevented by the supplementation HF with *n*-3 PUFA either in the form of PL or TG [6,21]. Batetta et al. concluded that such anti-inflammatory effects can be due to observed lower levels of arachidonic acid in membrane phospholipids [24].

Recent studies revealed the complementary role of metabolic endotoxemia in the low-grade inflammation. Laugerette et al. observed that endotoxin transporter LBP was positively correlated with plasma IL-6 in mice fed a palm oil-based high-fat diet, which was reversed using rapeseed oil [42]. Other works evidenced a link between low-grade inflammation or related metabolic disorders and plasma LBP and sCD14 [43,44]. In our study, the HF group presented the highest plasma concentration of LBP, consistently with inflammatory markers. A significant decrease in the level of plasma sCD14 was observed in HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups. Altogether, our results indicate that the supplementation of HF diet with LC *n*-3 PUFA can lower plasma concentrations of endotoxin transporters. Further mechanisms should be investigated to elucidate the implication of *n*-3 PUFA sources in the regulation of endotoxemia-induced metabolic inflammation.

Circulating leptin levels are directly associated with the mass of WAT and inflammation [45]. Our results showed that the plasma levels of leptin, mainly produced by adipocytes, were decreased in the two supplemented groups with LC *n*-3 PUFA in the form of PL or TG vs HF mice. Plasma leptin was also lower in HF- ω 3TG group independently of WAT mass, suggesting a relationship between the lower metabolic inflammation and the leptin. Our results are in agreement with a previous study showing that long-term intake of dietary *n*-3 PUFA by rats resulted in a significant decrease in plasma leptin levels [46].

Adiponectin plays an important role as insulin-sensitizing adipokine which production is decreased in obesity and in conditions associated with insulin resistance [5,47]. In our study, we did not observed a significant difference in circulating adiponectin level among groups. In addition, the glucose and insulin tolerances were not affected by the different diets. Our results are in agreement with previous study reporting that the level of adiponectin was not different between HF group (35% of fat) and DHA/EPA in the form of PL or TG supplemented to the HF diets for 8 weeks [21]. Conversely, other studies showed a decrease in the level of plasma adiponectin after feeding mice a HF diet; this level was restored by the supplementation HF diet with DHA and EPA [6,29]. Altogether, such modifications in plasma adiponectin concentrations are reported with different lipid types (*n*-6 PUFA-rich corn oil instead of lard) and/or concentrations in the diet (35% w/w instead of 20%) and using larger doses of fish oil (15-40% in total dietary lipids) compared with the present study (5%).

Regarding adiposity, HF diet did not induce significantly higher body weight gain than the low fat control, although a trend towards heavier adipose tissue was observed. This can be due to our choice of preparing LF and HF groups using similar ingredients. Both LF and HF were semi-synthetic and based mainly on corn starch and casein, while many studies in the literature reach weight gain by comparing semi-synthetic high-fat diet with regular chow based on more various ingredients [48]. Among the HF diets, HF- ω 3PL diet led to a lower weight gain and a reduced adipose tissue compared with HF group without affecting the mass of muscles. However these effects were not observed in mice fed HF- ω 3TG. These results suggest that the PL carrier can decrease body fat deposition more than the TG carrier. This is consistent with a previous study reporting that obese mice fed LC *n*-3 PUFA carried by PL developed less body weight gain than those fed LC *n*-3 PUFA carried by TG [21]. We further investigated the effect of HF diet containing LC *n*-3 PUFA in the

form of PL or TG on the cell size distribution of adipose tissue by using the Coulter counter method (Multisizer IV, Beckman Coulter) which allows a more precise cell-size distribution because the number of cell counted is much higher than the one of microscopic methods. The most noticeable difference between groups was in the adipocyte size distribution. Mice fed HF diet showed an increased adipocyte size compared with those fed the LF diet. Differential effects were observed regarding LC *n*-3 PUFA supplementation; HF- ω 3PL and LF diets induced similar adipocyte size whereas HF- ω 3TG and HF diets led to larger adipocytes. Our results following a 20% w/w high-fat diet for 8 weeks are consistent with those of Rossmeisl et al. [21]. These authors observed that the PL carrier decreased adipocyte area compared with the control HF diet in obese mice, which was not observed using the TG carrier. Of note, endothelial lipase presents specificity towards DHA-containing PL, thus generating Lyso-PL containing DHA [49]. Moreover, our PL source also contained Lyso-PC-DHA. We may hypothesize that such DHA-containing lipid species might exert specific biological activity, because superior biological effects of LysoPC-DHA have otherwise been demonstrated regarding DHA accretion in the brain and anti-inflammatory activity [50,51]. However, further research is required to better understand the mechanism of action of PL carrier.

Skurk et al. investigated the secretory capacity of adipocyte fractions from the same individual. They demonstrated that the large adipocytes were implicated in the induction of pro-inflammatory genes such as those coding for IL-6 and MCP-1 [52]. Consistently, HF diet-induced-inflammation can be associated with large adipocytes. Regarding the impact of supplementing with *n*-3 PUFA, noticeably, the HF- ω 3PL diet had a greater anti-adiposity effect than the HF- ω 3TG diet associated with smaller adipocytes. Here, the anti-adiposity effect of HF- ω 3PL diet could be partly associated with the lower metabolic inflammation in the mice. In contrast, the anti-inflammatory effect of HF- ω 3TG was not associated with a decrease in adiposity.

We further investigated the effect of the composition of the dietary high-fat, and more specifically of the presence of LC *n*-3 PUFA on lipid peroxidation and oxidative stress. LC PUFA are molecules susceptible to oxidation because they contain many double bonds. PUFA oxidation leads to the formation of secondary end-products such as 4-HNE derived from *n*-6 PUFA and 4-HHE derived from *n*-3 PUFA [53]. Our previous studies in mice showed that these markers can induce oxidative stress and inflammation, even when

consumed in moderately oxidized dietary fat [30]. They also provoke oxidative stress *in vitro* in Caco-2 cells [30]. In the present study, similar levels of plasma 4-HHE were measured in the three HF mice groups; however the plasma level of 4-HNE was increased in HF mice compared with the other groups. Previously, Esterbauer et al. found that the basal concentrations of 4-HNE in the human serum were in the range 0–700 nM. In our study, plasma 4-HNE in mice remained within this range observed in humans [54]. In liver and in WAT, the levels of 4-hydroxy-2-alkenals were lower than 2 nmol/g, which is in the same order of magnitude than in another study reporting basal concentrations of 4-HNE in the liver of mice [55]. We thus suggest that the dietary high-fat used in this study may slightly enhance the oxidative stress through the induction of 4-HNE in plasma, albeit without increase of 4-HNE in tissues. LC *n*-3 PUFA supplementation prevented this phenomenon.

We propose that the increase of oxidative stress after HF diet consumption is linked to an alteration of anti-oxidant defenses. In the gastro-intestinal tract, a defense system including GPx2, is able to detoxify lipid peroxidation products and protect against inflammation [30,56,57]. Our results show a significant increase of GPx2 mRNA in the duodenum of mice fed HF *vs* HF- ω 3PL diets. Interestingly, a significant difference of GPx2 mRNA in the jejunum was also observed between HF *vs* HF- ω 3PL mice. Meanwhile, we observed a significant difference between HF *vs* HF- ω 3TG groups in the jejunum. This suggests that (i) the HF diet-induced-inflammation could alter the anti-oxidant defense system in the intestine and (ii) the supplementation of HF diet with LC *n*-3 PUFA in the form of PL is more bioactive in the upper intestine than those in the form of TG.

Regarding the concentration of α -tocopherol, a lipid-soluble antioxidant vitamin, we show that it was significantly increased in the WAT of HF- ω 3PL and HF- ω 3TG groups as compared to HF mice. Interestingly, tocopherol level in WAT was significantly greater in HF- ω 3PL than in HF- ω 3TG mice. Of note, in this study we took care to adjust dietary tocopherol to obtain similar concentrations in our diets. Thus, our results can be attributed to the direct effects of PL-bound *vs* TG-bound LC *n*-3 PUFA. Consistently, Choi et al. recently reported that high-fat diet enhanced the oxidative stress through the decreased level of tocopherols in the livers of rats [58]. Thus, our findings suggest that dietary supplementation with LC *n*-3 PUFA is beneficial for decreasing lipid peroxidation in high fat-fed mice, and that the PL carrier may induce a superior bioavailability to tocopherols or

lower need for their use to counteract oxidative stress. The enhanced level of α -tocopherol following LC *n*-3 PUFA in the form of PL can also be an effective defense against oxidative stress and inflammation. Further studies should analyze the amount and distribution of vitamin E among different tissues after the diets. The effect of dietary *n*-3 PUFA in the form of PL and TG on the activity of anti-oxidant systems should also be clarified by further studies in humans. Altogether, HF diet induced concomitant increase in plasma 4-HNE, GPx-2 activation in the small intestine and lower tocopherol level in WAT; all of these markers being reversed by the supplementation with LC *n*-3 PUFA.

Conclusion

In conclusion, our study demonstrates in mice that long-term ingestion of *n*-3 PUFA prevents HF diet-induced inflammation and oxidative stress. Compared with triacylglycerols, LC *n*-3 PUFA supplemented in the form of PL exhibit superior beneficial metabolic effects by decreasing adiposity, reducing adipocyte size and stimulating the anti-oxidant system. Our findings should be strengthened by dietary intervention studies in human aimed at testing the impact of different LC *n*-3 PUFA molecular forms on the structure and metabolism of adipose tissue. Such findings could support the development of functional foods containing LC *n*-3 PUFA in the form of PL participating to the prevention of the development of chronic metabolic diseases in humans like obesity

Abbreviations: PUFA, Polyunsaturated fatty acids; LF, Low fat; HF, High-fat; DHA, Docosahexaenoic acid; EPA, Eicosapentaenoic acid; TG, Triacylglycerols; PL, Phospholipids; WAT, White adipose tissue; 4-HHE, 4-hydroxy-2-hexenal; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; GPx2, Gastrointestinal glutathione peroxidase 2; IL, Interleukin; MCP-1, Monocyte chemotactic protein-1; LBP, Lipopolysaccharide binding protein; sCD14, Soluble cluster of differentiation

V. References

1. Hotamisligil GS: **Inflammation and metabolic disorders.** *Nature* 2006, **444**:860–867.
2. Manabe I: **Chronic inflammation links cardiovascular, metabolic and renal diseases.** *Circ J* 2011, **75**:2739–2748.
3. Zulet MA, Puchau B, Navarro C, Marti A, Martinez JA: **Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies.** *Nutr Hosp* 2007, **22**:511–527.
4. Waki H, Tontonoz P: **Endocrine functions of adipose tissue.** *Annu Rev Pathol* 2007, **2**:31–56.
5. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K: **Adipokines in inflammation and metabolic disease.** *Nat Rev Immunol* 2011, **11**:85–97.
6. Todoric J, Loffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Zeyda M, Waldhausl W, Stulnig TM: **Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids.** *Diabetologia* 2006, **49**:2109–2119.
7. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr: **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *J Clin Invest* 2003, **112**:1796–1808.
8. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: **Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.** *J Clin Invest* 2003, **112**:1821–1830.
9. Park S, Park NY, Valacchi G, Lim Y: **Calorie restriction with a high-fat diet effectively attenuated inflammatory response and oxidative stress-related markers in obese tissues of the high diet fed rats.** *Mediators Inflamm* 2012, **2012**:984643.
10. Lankinen M, Schwab U, Erkkila A, Seppanen-Laakso T, Hannila ML, Mussalo H, Lehto S, Uusitupa M, Gylling H, Oresic M: **Fatty fish intake decreases lipids related to inflammation and insulin signaling—a lipidomics approach.** *PLoS One* 2009, **4**:e5258.
11. Kopecky J, Rossmeisl M, Flachs P, Kuda O, Brauner P, Jilkova Z, Stankova B, Tvrzicka E, Bryhn M: **n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function.** *Proc Nutr Soc* 2009, **68**:361–369.
12. Flachs P, Rossmeisl M, Bryhn M, Kopecky J: **Cellular and molecular effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on adipose tissue biology and metabolism.** *Clin Sci (Lond)* 2009, **116**:1–16.
13. Defilippis AP, Blaha MJ, Jacobson TA: **Omega-3 Fatty acids for cardiovascular disease prevention.** *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2010, **12**:365–380.
14. Leaf A: **Cardiovascular effects of fish oils.** *Beyond the platelet. Circulation* 1990, **82**:624–628.

15. Hashimoto M, Hossain S: **Neuroprotective and ameliorative actions of polyunsaturated fatty acids against neuronal diseases: beneficial effect of docosahexaenoic acid on cognitive decline in Alzheimer's disease.** *J Pharmacol Sci* 2011, **116**:150–162.
16. Bousquet M, Calon F, Cicchetti F: **Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease.** *Ageing Res Rev* 2011, **10**:453–463.
17. EFSA: **Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol.** *EFSA Journal* 2010, **8**:1461. doi:10.2903/j.efsa.2010.1461.
18. Tou JC, Jaczynski J, Chen YC: **Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits.** *Nutr Rev* 2007, **65**:63–77.
19. Calder PC: **The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability.** *Mol Nutr Food Res* 2012, **56**:1073–1080.
20. Morizawa KTY, Tsuchida M, Nakano Y, Hibino H, Tanaka Y: **Dietary oils and phospholipids containing n-3 highly unsaturated fatty acids suppress 2,4-dinitro-1-fluorobenzene-induced contact dermatitis in mice.** *J Jpn Oil Chem Soc* 2000, **49**:59–65.
21. Rossmesl M, Jilkova ZM, Kuda O, Jelenik T, Medrikova D, Stankova B, Kristinsson B, Haraldsson GG, Svensen H, Stoknes I, Sjovall P, Magnusson Y, Balvers MG, Verhoeckx KC, Tvrzicka E, Bryhn M, Kopecky J: **Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids.** *PLoS One* 2012, **7**:e38834.
22. Hiratsuka S, Ishihara K, Kitagawa T, Wada S, Yokogoshi H: **Effect of dietary docosahexaenoic acid connecting phospholipids on the lipid peroxidation of the brain in mice.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2008, **54**:501–506.
23. Hiratsuka S, Koizumi K, Ooba T, Yokogoshi H: **Effects of dietary docosahexaenoic acid connecting phospholipids on the learning ability and fatty acid composition of the brain.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009, **55**:374–380.
24. Batetta B, Griinari M, Carta G, Murru E, Ligresti A, Cordeddu L, Giordano E, Sanna F, Bisogno T, Uda S, Collu M, Bruheim I, Di Marzo V, Banni S: **Endocannabinoids may mediate the ability of (n-3) fatty acids to reduce ectopic fat and inflammatory mediators in obese Zucker rats.** *J Nutr* 2009, **139**:1495–1501.
25. Bunea R, El Farrah K, Deutsch L: **Evaluation of the effects of Neptune Krill Oil on the clinical course of hyperlipidemia.** *Altern Med Rev* 2004, **9**:420–428.
26. Vigerust NF, Bjorndal B, Bohov P, Brattelid T, Svardal A, Berge RK: **Krill oil versus fish oil in modulation of inflammation and lipid metabolism in mice transgenic for TNF-alpha.** *Eur J Nutr*, doi:10.1007/s00394-012-0441-2. In press.

27. Ulven SM, Kirkhus B, Lamglait A, Basu S, Elind E, Haider T, Berge K, Vik H, Pedersen JI: **Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers.** *Lipids* 2011, **46**:37–46.
28. Maki KC, Reeves MS, Farmer M, Griinari M, Berge K, Vik H, Hubacher R, Rains TM: **Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women.** *Nutr Res* 2009, **29**:609–615.
29. Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J: **Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet.** *Diabetologia* 2006, **49**:394–397.
30. Awada M, Soulage CO, Meynier A, Debard C, Plaisancie P, Benoit B, Picard G, Loizon E, Chauvin MA, Estienne M, Peretti N, Guichardant M, Lagarde M, Genot C, Michalski MC: **Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells.** *J Lipid Res* 2012, **53**:2069–2080.
31. Chiang YF, Shaw HM, Yang MF, Huang CY, Hsieh CH, Chao PM: **Dietary oxidised frying oil causes oxidative damage of pancreatic islets and impairment of insulin secretion, effects associated with vitamin E deficiency.** *Br J Nutr* 2011, **105**:1311–1319.
32. Michalski MC, Calzada C, Makino A, Michaud S, Guichardant M: **Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk—a preliminary study.** *Mol Nutr Food Res* 2008, **52**:1478–1485.
33. Lefils J, Geloën A, Vidal H, Lagarde M, Bernoud-Hubac N: **Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice.** *Br J Nutr* 2010, **104**:1304–1312.
34. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *J Biol Chem* 1957, **226**:497–509.
35. Buttriss JL, Diplock AT: **High performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues.** *Methods Enzymol* 1984, **105**:131–138.
36. Etherton TD, Thompson EH, Allen CE: **Improved techniques for studies of adipocyte cellularity and metabolism.** *J Lipid Res* 1977, **18**:552–557.
37. Calder PC: **Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases.** *Mol Nutr Food Res* 2008, **52**:885–897.
38. Wan JB, Huang LL, Rong R, Tan R, Wang J, Kang JX: **Endogenously decreasing tissue n-6/n-3 fatty acid ratio reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting systemic and vascular inflammation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**:2487–2494.
39. James MJ, Gibson RA, Cleland LG: **Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production.** *Am J Clin Nutr* 2000, **71**:343S–348S.

40. Krebs JD, Browning LM, McLean NK, Rothwell JL, Mishra GD, Moore CS, Jebb SA: **Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women.** *Int J Obes (Lond)* 2006, **30**:1535–1544.
41. Kiecolt-Glaser JK, Belury MA, Andridge R, Malarkey WB, Hwang BS, Glaser R: **Omega-3 supplementation lowers inflammation in healthy middle-aged and older adults: A randomized controlled trial.** *Brain Behav Immun* 2012, **26**:988–995.
42. Laugerette F, Furet JP, Debard C, Daira P, Loizon E, Geloën A, Soulagé CO, Simonet C, Lefils-Lacourtablaise J, Bernoud-Hubac N, Bodenec J, Peretti N, Vidal H, Michalski MC: **Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012, **302**:E374–E386.
43. Moreno-Navarrete JM, Manco M, Ibanez J, Garcia-Fuentes E, Ortega F, Gorostiaga E, Vendrell J, Izquierdo M, Martinez C, Nolfé G, Ricart W, Mingrone G, Tinahones F, Fernandez-Real JM: **Metabolic endotoxemia and saturated fat contribute to circulating NGAL concentrations in subjects with insulin resistance.** *Int J Obes (Lond)* 2010, **34**:240–249.
44. Regueiro V, Campos MA, Morey P, Sauleda J, Agusti AG, Garmendia J, Bengoechea JA: **Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 are increased in the bronchoalveolar lavage fluid of smokers.** *Eur Respir J* 2009, **33**:273–281.
45. Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Gomez-Reino JJ, Gualillo O: **Leptin: a metabolic hormone that functions like a proinflammatory adipokine.** *Drug News Perspect* 2006, **19**:21–26.
46. Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, Brude IR, Nenseter MS, Christiansen EN, Drevon CA: **Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids.** *J Lipid Res* 2001, **42**:743–750.
47. Ohashi K, Ouchi N, Matsuzawa Y: **Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin.** *Biochimie* 2012, **94**:2137–2142.
48. Warden CH, Fisler JS: **Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding.** *Cell Metab* 2008, **7**:277.
49. Chen S, Subbaiah PV: **Phospholipid and fatty acid specificity of endothelial lipase: potential role of the enzyme in the delivery of docosahexaenoic acid (DHA) to tissues.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1771**:1319–1328.
50. Hung ND, Kim MR, Sok DE: **Oral administration of 2-docosahexaenoyl lysophosphatidylcholine displayed anti-inflammatory effects on zymosan A-induced peritonitis.** *Inflammation* 2011, **34**:147–160.
51. Lagarde M, Bernoud N, Brossard N, Lemaitre-Delaunay D, Thies F, Croset M, Lecerf J: **Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain.** *J Mol Neurosci* 2001, **16**:201–204. Discussion 215–221.

52. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H: **Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion.** *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**:1023–1033.
53. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H: **Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.** *Free Radic Biol Med* 1991, **11**:81–128.
54. Esterbauer H: **Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products.** *Am J Clin Nutr* 1993, **57**:779S–785S. Discussion 785S-786S.
55. Warnke MM, Wanigasekara E, Singhal SS, Singhal J, Awasthi S, Armstrong DW: **The determination of glutathione-4-hydroxynonenal (GSHNE), E-4-hydroxynonenal (HNE), and E-1-hydroxynon-2-en-4-one (HNO) in mouse liver tissue by LC-ESI-MS.** *Anal Bioanal Chem* 2008, **392**:1325–1333.
56. Esworthy RS, Yang L, Frankel PH, Chu FF: **Epithelium-specific glutathione peroxidase, GPx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice.** *J Nutr* 2005, **135**:740–745.
57. Wingler K, Muller C, Schmehl K, Florian S, Brigelius-Flohe R: **Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells.** *Gastroenterology* 2000, **119**:420–430.
58. Choi SK, Zhang XH, Seo JS: **Suppression of oxidative stress by grape seed supplementation in rats.** *Nutr Res Pract* 2012, **6**:3–8.

Additional file 1

	Tuna oil		Purified PL-DHA	
	%	Q mg/g lipid	%	Q mg/g lipid
14 :0	3.9 ± 0.4	25.3 ± 3.8	0.1 ± 0.0	0.35 ± 0.1
15 :0	1.2 ± 0.1	7.6 ± 0.3		
16 :0	22.5 ± 0.9	145.7 ± 7.8	3.7 ± 0.2	17.4 ± 1.8
18 :0	6.5 ± 0.1	41.8 ± 2.7	2.0 ± 0.1	9.4 ± 1.0
20 :0	0.4 ± 0.0	2.6 ± 0.3	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1
SFA	34.9 ± 1.2	222.9 ± 13.4	6.3 ± 0.3	29.1 ± 2.2
16 :1 <i>n</i> -9	0.8 ± 0.1	5.4 ± 0.3	0.05 ± 0.02	0.2 ± 0.1
16 :1 <i>n</i> -7	4.8 ± 0.2	30.8 ± 1.9	0.3 ± 0.0	1.5 ± 0.1
18 :1 <i>n</i> -9	17.9 ± 0.3	115.6 ± 7.1	20.5 ± 0.5	95.6 ± 10.8
20 :1	1.5 ± 0.0	9.9 ± 0.7	0.4 ± 0.2	1.8 ± 0.9
24 :1	0.4 ± 0.1	2.5 ± 0.6	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0
MUFA	25.2 ± 0.7	161.7 ± 9.5	22.1 ± 0.4	103.1 ± 11.7
18 :2 <i>n</i> -6	2.0 ± 0.2	13.0 ± 1.5	11.2 ± 0.2	52.0 ± 6.0
20 :2 <i>n</i> -6	0.3 ± 0.1	2.0 ± 0.7	0.3 ± 0.0	1.4 ± 0.1
20 :3 <i>n</i> -6	0.2 ± 0.0	1.0 ± 0.1	0.4 ± 0.0	1.7 ± 0.2
20 :4 <i>n</i> -6	2.6 ± 0.1	17.0 ± 1.4	3.9 ± 0.0	18.2 ± 2.1
<i>n</i> -6	5.1 ± 0.2	33.0 ± 3.0	18.2 ± 0.2	84.8 ± 9.5
18 :3 <i>n</i> -3	1.0 ± 0.7	6.6 ± 4.5	1.2 ± 0.0	5.7 ± 0.6
20 :4 <i>n</i> -3	0.5 ± 0.2	3.4 ± 1.3	0.6 ± 0.0	2.6 ± 0.4
20 :5 <i>n</i> -3	6.9 ± 0.2	44.6 ± 3.9	8.8 ± 0.1	41.0 ± 5.0
22 :5 <i>n</i> -3	1.2 ± 0.1	7.7 ± 0.8	5.3 ± 0.1	24.7 ± 2.5
22 :6 <i>n</i> -3	26.1 ± 1.1	169.0 ± 17.8	38.0 ± 0.8	177.3 ± 23.0
<i>n</i> -3	35.2 ± 1.6	231.3 ± 23.3	54.1 ± 0.9	252.6 ± 31.8
PUFA	40.3 ± 1.7	264.3 ± 26.0	72.3 ± 1.0	337.4 ± 41.3
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	0.14 ± 0.01		0.34 ± 0.00	
Q AG		646.4 ± 46.3		461.9 ± 48.8
Total tocopherols μg.g ⁻¹ lipids	851 ± 25		traces	

Additional file 1. Fatty acid composition both in tuna oil and in purified PL-DHA

Additional file 2

Major FA (mol/100 mol FA):	Liver				eWAT			
	LF	HF	HF- ω 3PL	HF- ω 3TG	LF	HF	HF- ω 3PL	HF- ω 3TG
SFA	33.3 \pm 0.5 ^{\$}	31.6 \pm 0.6	36.0 \pm 0.6 ^{*\$}	34.6 \pm 0.4 ^{\$}	22.7 \pm 1.9	23.5 \pm 1.8	23.5 \pm 2.6	25.8 \pm 2.5
16:1 <i>n</i> -7	3.4 \pm 0.3	1.5 \pm 0.2 ^{\$}	1.2 \pm 0.1 ^{\$}	1.8 \pm 0.1 ^{\$}	7.7 \pm 0.8	5.3 \pm 0.5 ^{\$}	5.1 \pm 1.2 ^{\$}	5.3 \pm 0.9 ^{\$}
18:1 <i>n</i> -7	3.8 \pm 0.3	2.7 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1	03.0 \pm 0.1	3.2 \pm 0.3	3.0 \pm 0.1	2.7 \pm 0.2	2.9 \pm 0.1
18:1 <i>n</i> -9	21.9 \pm 2.7	25.1 \pm 1.9 [*]	20.4 \pm 1.2 [*]	21.6 \pm 1.3 [*]	44.8 \pm 0.5	49.8 \pm 0.7 ^{\$}	49.3 \pm 1.1 ^{\$}	48.2 \pm 0.4 ^{\$}
MUFA	34.1 \pm 1.3	34.5 \pm 1.7	27.1 \pm 1.2	30.2 \pm 1.3	58.3 \pm 0.4	60.5 \pm 0.6	59.7 \pm 0.7	58.7 \pm 0.4
18:2 <i>n</i> -6	12.1 \pm 0.4	12.6 \pm 0.2	13.6 \pm 0.4	12.1 \pm 0.2	16.9 \pm 0.7	14.7 \pm 0.3	15.0 \pm 1.4	13.7 \pm 0.7
20:4 <i>n</i> -6	11.1 \pm 0.4	11.9 \pm 0.5	10.1 \pm 0.4	9.0 \pm 0.4	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
<i>n</i> -6	24.7 \pm 0.7	27.3 \pm 0.7 ^{\$}	26.8 \pm 0.4 ^{\$}	23.4 \pm 0.5	17.2 \pm 0.7	14.9 \pm 0.3	15.3 \pm 1.4	14.3 \pm 0.7
18:3 <i>n</i> -3	0.4 \pm 0.0 ^{\$}	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	1.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0 ^{\$}	0.7 \pm 0.1 ^{\$}	0.6 \pm 0.0 ^{\$}
20:5 <i>n</i> -3	0.7 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0 [£]	0.4 \pm 0.0 ^{\$£}	0.8 \pm 0.0 [*]	Tr	Tr	0.1 \pm 0.0 ^{*\$£}	0.2 \pm 0.0 ^{\$*}
22:6 <i>n</i> -3	6.0 \pm 0.3	5.3 \pm 0.4	8.8 \pm 0.3 ^{*\$£}	10.2 \pm 0.4 ^{*\$}	Tr	Tr	0.2 \pm 0.0 ^{*\$£}	0.4 \pm 0.0 ^{\$*}
<i>n</i> -3	7.9 \pm 0.4	6.6 \pm 0.4	9.9 \pm 0.3 ^{\$*}	11.7 \pm 0.4 ^{\$*}	1.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1 ^{\$}	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 ratio	3.2 \pm 0.1 [*]	4.2 \pm 0.2	2.7 \pm 0.1 [*]	2.0 \pm 0.4 [*]	11.8 \pm 0.3 [*]	23.3 \pm 1.6	14.2 \pm 0.9 [*]	12.4 \pm 0.8 [*]

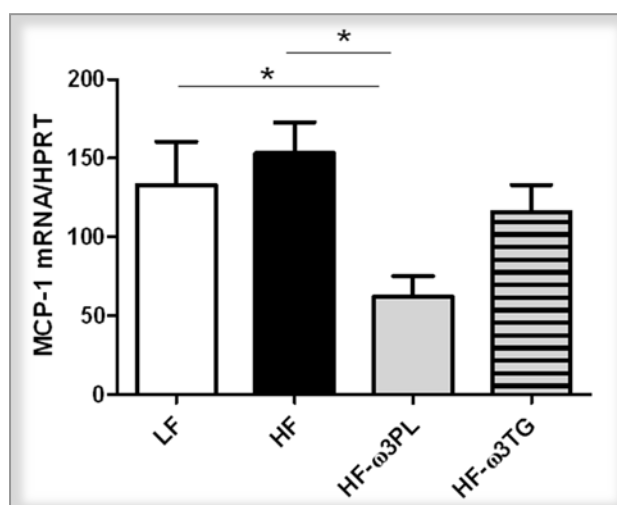
Additional file 2. Fatty acid profile in liver and eWAT of mice fed different diets. (*P<0.05 vs HF); (^{\$}P<0.05 vs LF); ([£]P<0.05 vs HF- ω 3TG). Data are mean \pm SEM for n=5-7 per group for eWAT and n=8-9 per group for liver. Abbreviations: Tr, traces; eWAT: epididymal white adipose tissue FA, fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

Additional file 3

Major FA in rWAT				
Total FA (mol/100 mol FA):	LF	HF	HF- ω 3PL	HF- ω 3TG
SFA	22.6 \pm 0.9	25.3 \pm 1.5	25.1 \pm 1.2	26.1 \pm 1.1
16:1 <i>n</i> -7	8.5 \pm 0.8	5.0 \pm 0.6 ^{\$}	4.2 \pm 0.3 ^{\$}	5.7 \pm 0.2 ^{\$}
18:1 <i>n</i> -7	3.3 \pm 0.4	2.9 \pm 0.3	3.0 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1
18:1 <i>n</i> -9	47.2 \pm 1.3	51.5 \pm 1.5 ^{\$}	52.8 \pm 1.2 ^{\$}	50.3 \pm 0.8 ^{\$}
MUFA	61.9 \pm 0.1	62.0 \pm 1.4	63.2 \pm 1.3	61.6 \pm 0.8
18:2 <i>n</i> -6	13.6 \pm 0.9	11.5 \pm 0.4	10.1 \pm 0.2 ^{\$}	10.8 \pm 0.4 ^{\$}
20:4 <i>n</i> -6	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0
<i>n</i> -6	14.2 \pm 0.8	12.2 \pm 0.4	10.8 \pm 0.3 ^{\$}	11.4 \pm 0.5 ^{\$}
18:3 <i>n</i> -3	1.2 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1 ^{\$}	0.5 \pm 0.1 ^{\$}	0.5 \pm 0.0 ^{\$}
20:5 <i>n</i> -3	Tr [£]	Tr [£]	Tr [£]	0.1 \pm 0.0
22:6 <i>n</i> -3	Tr	Tr	0.1 \pm 0.1 ^{*\$£}	0.3 \pm 0.1 ^{*\$}
<i>n</i> -3	1.3 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0 ^{\$}	0.8 \pm 0.1 ^{*\$}	1.0 \pm 0.0 ^{*\$}
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 ratio	11.1 \pm 0.2 [*]	21.7 \pm 1.6	13.9 \pm 1.4 [*]	11.8 \pm 0.6 [*]

Additional file 3. Fatty acid profile in rWAT in mice fed different diets. (* $P < 0.05$ vs HF); (^{\$} $P < 0.05$ vs LF); ([£] $P < 0.05$ vs HF- ω 3TG). Data are mean \pm SEM for $n = 4-5$ per group. Abbreviations: Tr, traces; rWAT, retroperitoneal white adipose tissue; FA, fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

Additional file 4



Additional file 4. MCP1 mRNA level in retroperitoneal white adipose tissue (rWAT). Bars represents means \pm SEM of $n = 5-6$ mice. (* $P < 0.05$). ANOVA followed by Fisher test.

CHAPITRE IV: PUBLICATION [2]

Dietary oxidized *n*-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells

Publiée le 3 Août 2012 dans « Journal of Lipid Research »

Résumé du chapitre IV

Le stress oxydant et l'inflammation sont des facteurs majeurs impliqués dans le développement de nombreuses pathologies comme les maladies cardiovasculaires et les maladies métaboliques chez l'Homme, incluant l'obésité et le diabète de type II. De nombreuses études ont rapporté les effets bénéfiques de la consommation des AGPI-LC *n*-3 comme le DHA et l'EPA sur la santé, notamment la prévention du développement de diverses maladies liées à l'inflammation.

Actuellement, les recommandations nutritionnelles émises dans les sociétés occidentales portent sur la nécessité d'augmenter la part relative d'AGPI-LC *n*-3 dans l'alimentation. Cependant, ces AGPI alimentaires sont très sensibles à la peroxydation lipidique à cause de leurs nombreuses insaturations. Ce phénomène est l'un des problèmes majeurs dans l'alimentation car il peut affecter la qualité nutritionnelle des produits alimentaires concernés. En effet, lors de l'oxydation, les AGPI-LC *n*-3 produisent des espèces réactives telles que le 4-hydroxyhexénal (4-HHE), qui est reconnu pour ses effets cytotoxiques et génotoxiques au niveau cellulaire et tissulaire. Toutefois, aucune étude n'a été menée à ce jour pour élucider les effets biologiques de l'ingestion de produits d'oxydation finaux des AGPI par l'alimentation et leur devenir métabolique notamment sur la génération de l'inflammation et de stress oxydant.

De plus, au cours de la consommation des aliments, l'intestin est la partie de l'organisme potentiellement la plus exposée à ces produits d'oxydation. Cependant, peu de données existent pour confirmer l'absorption de ces produits d'oxydation par l'intestin et s'ils y exercent des altérations métaboliques au cours de la digestion.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse qu'une consommation à long-terme d'un régime hyperlipidique supplémenté en une quantité recommandée d'AGPI *n*-3 modérément oxydés pourrait contrecarrer leurs effets bénéfiques sur la santé, notamment à cause de l'absorption intestinale du 4-HHE et de sa réactivité cellulaire.

Ainsi les objectifs de cette étude visent à :

- 1) étudier chez la souris les effets d'un régime supplémenté en AGPI-LC *n*-3 en quantité modérée, sous forme oxydée *vs* non-oxydée, sur la génération de l'inflammation et de stress oxydant.
- 2) Evaluer la contribution possible de l'absorption et des effets cellulaires du 4-HHE dans l'induction de ces effets. Dans cette partie, nous avons testé cette hypothèse par une étude de gavage de souris avec du 4-HHE et *in vitro* sur un modèle cellulaire Caco-2/TC7.

Nos résultats ont pu mettre en évidence pour la première fois que (i) *in vivo*, la consommation d'AGPI *n*-3 modérément oxydés aboutit à une augmentation du produit final d'oxydation 4-HHE et de marqueurs inflammatoires dans la circulation sanguine et (ii) ceci peut être expliqué par la capacité des cellules intestinales à absorber les composés finaux d'oxydation des AGPI *in vitro*. Nos résultats suggèrent un lien entre l'absorption de ce composé et l'induction du stress oxydant et de l'inflammation au niveau intestinal. Ces résultats appellent à prendre des précautions dans la formulation et la conservation des aliments et compléments enrichis en AGPI-LC *n*-3.

**Dietary oxidized *n*-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation:
role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells**

Manar Awada,^{†,§} Christophe O. Soulage,[†] Anne Meynier,[‡] Cyrille Debard,[£]
Pascale Plaisancié,[§] Bérengère Benoit,[§] Grégory Picard,[§] Emmanuelle Loizon,[§]
Marie-Agnès Chauvin,[£] Monique Estienne,[§] Noël Peretti,[§] Michel Guichardant,[†]
Michel Lagarde,[†] Claude Genot[‡] and Marie-Caroline Michalski^{*,§,†,£}

[§]Université de Lyon, Univ Lyon-1, F-69622, Villeurbanne, France ; [§]INRA, U1235 CarMeN laboratory, F-69621, Villeurbanne, France ; [†]INSA-Lyon, IMBL, F-69621, Villeurbanne, France ; [£]INSERM U1060, CarMeN laboratory, F-69921, Oullins, France ; [‡]INRA, UR1268 Biopolymères Interactions Assemblages, F-44300, Nantes, France.

Short title: Dietary oxidized *n*-3 PUFA: intestinal and metabolic effects

Supplementary key words: Nutrition; polyunsaturated fatty acids; lipid peroxidation; 4-hydroxy-2-alkenals; intestine.

* Corresponding author, to whom reprints may be requested

INRA U1235, INSERM U1060, Cardiovasculaire Métabolisme diabétologie et Nutrition, CarMeN Laboratory, InFoLip team, Bâtiment IMBL, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE cedex, France. Tel: +33 4 72 43 81 12 - Fax: +33 4 72 43 85 24
E-mail : marie-caroline.michalski@insa-lyon.fr

Abbreviations: 4-HHE, 4-hydroxy-2-hexenal; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal; NF-κB, Nuclear Factor kappaB; GPx2, gastrointestinal glutathione peroxidase 2; GRP78, glucose-regulated protein 78; IL, interleukin; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; DHA, docosahexaenoic acid; TG, dietary triacylglycerols; PL, phospholipids; TAG: plasma triacylglycerols; ER, endoplasmic reticulum; HF, high-fat; BLM: basolateral medium; Lyz-1: lysozyme 1.

Abstract

Dietary intake of long-chain *n*-3 PUFA is now widely advised for public health and in medical practice. However, PUFA are highly prone to oxidation, producing potentially deleterious 4-hydroxy-2-alkenals. Even so, the impact of consuming oxidized *n*-3 PUFA on metabolic oxidative stress and inflammation is poorly described. We therefore studied such effects and hypothesized the involvement of the intestinal absorption of 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE), an oxidized *n*-3 PUFA end-product.

In vivo, 4 groups of mice were fed for 8 weeks high-fat-diets containing moderately oxidized or unoxidized *n*-3 PUFA. Other mice were orally administered 4-HHE and euthanized postprandially *vs* baseline mice. *In vitro*, human intestinal Caco-2/TC7 cells were incubated with 4-hydroxy-2-alkenals.

Oxidized diet increased 4-HHE plasma levels in mice (up to 5-fold, $P < 0.01$) compared with unoxidized diet. Oxidized diet enhanced plasma inflammatory markers and activation of NFkappaB in the small intestine together with decreasing Paneth cell number (up to -19% in the duodenum). Both *in vivo* and *in vitro*, intestinal absorption of 4-HHE occurred associated with 4-HHE-protein adducts and increased expression of glutathione peroxidase 2 (GPx2) and glucose-regulated protein 78 (GRP78).

Consumption of oxidized *n*-3 PUFA results in 4-HHE accumulation in blood after its intestinal absorption and triggers oxidative stress and inflammation in the upper intestine.

I. Introduction

Chronic inflammation and oxidative stress are now recognized as major factors involved in the pathogenesis of several current diseases such as overweight, obesity and cardiovascular diseases (1-3). Elevated levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as interleukins (IL) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), are hallmarks of the metabolic syndrome (1, 2). Several studies demonstrate the nutritional benefits of consuming long-chain (LC) *n*-3 PUFA from fish, in particular docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 *n*-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 *n*-3) to protect against several pathologies (4-7). Therefore, nutritional recommendations in Western societies have been established for *n*-3 PUFA intake, of 500 mg/day of EPA and DHA, to achieve nutrient adequacy and reduce incidence of chronic diseases, particularly cardiovascular diseases (8).

However, current studies reveal that the *n*-3 PUFA may not be devoid of risk. Possible harmful effects of high levels of *n*-3 PUFA on retinal membrane degeneration have been described by Tanito et al (9). Therefore, dietary LC *n*-3 PUFA are highly vulnerable to oxidation, which is one of the major problems in food chemistry and may decrease their nutritional value. Indeed, peroxidation causes loss of nutritional quality and further leads to the generation of genotoxic and cytotoxic compounds such as the 4-hydroxy-2-alkenals (10, 11). 4-Hydroxy-2-hexenal (4-HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) are major end-products derived from *n*-3 and *n*-6 PUFA peroxidation, respectively. In addition to being markers of lipid peroxidation *in vivo*, 4-HNE and 4-HHE induce noxious effects on biological systems. These lipid aldehydes are prone to react with thiols and amines moieties and make Schiff base and/or Michael adducts with biomolecules such as proteins, DNA and phospholipids (12, 13). Numerous studies reported the genotoxicity and cytotoxicity of these 4-hydroxy-2-alkenals in pathophysiological contexts on tissues and cells (14-16), but nothing is known to date about the possible contribution of 4-hydroxy-2-alkenals being present in food products, their fate after ingestion and metabolic effects.

In this context, the intestinal tract represents the first barrier of detoxification and of defense against oxidative stress. Thus, intestinal cells can be exposed to oxidized PUFA or to lipid peroxidation end-products. However, evidence is lacking to support unfavorable health effects of dietary oxidized *n*-3 PUFA and demonstrate their possible role in the generation of oxidative stress and inflammation. Furthermore, limited data is available to

support the hidden assumption of intestinal absorption of dietary lipid oxidation by-products.

Therefore, we hypothesized that long-term intake of limited amounts of oxidized *n*-3 PUFA in high-fat (HF) diets could exert harmful health effects, due to the absorption of their end-products such as 4-HHE by the small intestine; the end-products having been formed during the processing, storage and/or final handling of foods or after their ingestion. The aim of the present study was thus to investigate (i) the effects of oxidized *n*-3 PUFA diets compared with unoxidized diets on oxidative stress and inflammation in mice and (ii) the possible implication of the intestinal absorption of some PUFA oxidation end-products, namely 4-hydroxy-2-alkenals, through their effects on intestinal stress and inflammation, *in vivo* and *in vitro*. Because several types of LC *n*-3 PUFA sources are present in human food, we tested lipid mixtures containing EPA and DHA carried by either triacylglycerols (TG) or phospholipids (PL). Moreover, we analyzed different segments of the absorptive intestinal epithelium, especially the duodenum before the interaction with bile salts occurs and the jejunum that represents the major site of lipid absorption, but also the ileum to test whether some effects remain in this more distal segment.

II. Materials & Methods

II.1. Materials

4-HHE and 4-HNE and trideuterated compounds were synthesized according to Soulère et al. (17). Omegavie® Tuna oil 25 DHA-flavorless, as a source of triacylglycerol rich in long-chain *n*-3 fatty acids (TG-DHA, 26% of DHA), lecithin rich in DHA (PL-DHA, 41% of DHA) and kiwi seed oil were provided by Polaris (Pleuven, France). Lard was supplied by Celys (Rezé, France), sunflower oil was from Lesieur® (Asnières-sur-Seine, France) and oleic sunflower oil from Olvéa (Marseille, France). Vegetable lecithin rich in linoleic acid 18:2 *n*-6 (PL-LA) was from Lipoid (Frigenstrasse, Germany).

II.2. Preparation of unoxidized and oxidized lipid blends and mice diets

Four lipid blends were prepared at the lab scale to obtain similar fatty acid composition and quantities in the four diets and similar amounts of glycerophospholipids and triacylglycerols. In these blends, DHA was supplied either in the form of triacylglycerols (TG diet) or phospholipids (PL diet), i.e., the name chosen for the diets reflects the type of molecules that carry long-chain *n*-3 PUFA in the diet. The oxidized lipid blends (TG-ox and PL-ox respectively) were prepared as described as follows: primary lipid mixtures for PL and TG groups were prepared with a small proportion of lard to maintain oxidability of PUFA. These preliminary oil mixtures were dispersed in 30% w/w relative to aqueous phase (mineral water; Evian) to prepare oil-in-water emulsions. The emulsions were then kept at 50°C in the dark with continuous shaking until oxidation level was considered as sufficient according to our previous experiments (estimated α -tocopherol contents of the blends decreased by 50%). Oxidized emulsions were then lyophilized and the resulting oxidized lipid mixtures completed with the necessary quantity of lard to reach the required final composition of lipid blends. The composition of the four diets is reported in **Table 1**.

High-fat containing <i>n</i> -3 PUFA as		PL	PL-ox	TG	TG-ox
Ingredient (g/100g)					
<u>Lipid mixture</u>		20	20	20	20
Among which:					
Lard		18.10	18.10	18.06	18.06
Sunflower oil		0.6	0.6	0.2	0.2
Oleic sunflower		0.4	0.4	-	-
Kiwi seed oil		0.1	0.1	0.02	0.02
Tuna oil (DHA located in TG)		-	-	0.9	0.9
Phospholipids					
PL-DHA (DHA located in PL)		0.8	0.8	-	-
Lecithin PL-LA		-	-	0.8	0.8
Corn starch		39	39	39	39
Sucrose		10	10	10	10
Pure cellulose		5	5	5	5
Vitamin mixture		5	5	5	5
Mineral mixture		1	1	1	1
Tocopherols ^a		0.099	0.099	0.092	0.084
Energy content (kJ/g)		18.14	18.14	18.14	18.14
Energy %	Lipids	41.5	41.5	41.5	41.5
	Protein	15.7	15.7	15.7	15.7
	Carbohydrates	34.1	34.1	34.1	34.1

Table 1. Composition of diets containing long-chain *n*-3 PUFA either esterified in phospholipids (PL diet) or in triacylglycerols (TG diet) and their oxidized counterparts (PL-ox, TG-ox). ^aConsidering the difference observed in tocopherols in lipid mixtures, which can affect their metabolic impact (46), care was taken to supplement lipid mixtures with α -tocopherol during formulation to achieve iso-tocopherol diets.

II.3. Animals and diets

Male C57BL/6 mice (8 wk, 20g) were from Janvier SA (Le Genest Saint-Isle, France) and were housed in a temperature-controlled room (22°C) with a 12 h light/12 h dark cycles. After 2 weeks of chow diet, mice were randomly divided into four groups of 12 mice and fed one of the 4 high-fat diets containing *n*-3 PUFAs: unoxidized groups: PL, TG; oxidized

groups: PL-ox, TG-ox. Animal experiments were performed under the authorization n°69-266-0501 (Direction Départementale des Services Vétérinaires du Rhône). All experiments were carried out according to the guidelines laid down by the French Ministry of Agriculture (n° 87-848) and the E.U. Council Directive for the Care and Use of Laboratory Animals of November 24th, 1986 (86/609/EEC), in conformity with the Public Health Service (PHS) Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. COS holds a special licence (n° 69266257) to experiment on living vertebrates issued by the French Ministry of Agriculture and Veterinary Service Department. Body weight was measured twice weekly and food intake was measured weekly. After 8 weeks, mice were euthanized by intraperitoneal (IP) injection of sodium pentobarbital. Plasma, liver, white adipose tissue and small intestine mucosa were collected.

II.4. Caco-2/TC7 cell culture and treatment

Caco-2/TC7 cells, which are the widely used *in vitro* model of human origin to test intestinal absorption of lipids, were provided by Monique Rousset (Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France) and used between passage 35 and 45. Cells were seeded in 75-cm² flasks (Falcon, Becton Dickinson) until 80–90% confluence. They were grown in complete DMEM (Gibco) supplemented with 20% heat-inactivated FBS (Gibco), 1% non-essential amino acids (Gibco) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin, Gibco), and maintained under a 10% CO₂ atmosphere at 37°C. For experiments, cells were seeded at a density of 25×10⁴ cells per filter on microporous (0.4 µm pore size) polyester filters (Transwell, Corning, USA) and grown to confluence in complete medium, which was routinely reached 7 days after seeding. The cells were used 21 days after seeding. Monolayers were incubated with 4-HHE or 4-HNE in the apical compartment (1 to 100 µM brought in DMSO at 0.5% in the final medium) and the basolateral compartment receiving serum-free DMEM. After incubation, basolateral media and cells were collected.

II.5. Animal treatment with 4-HHE

After an overnight fast, three groups of 4 male C57/BL6 mice (8 weeks, 22 g) were given a single application of 4-HHE diluted in water *via* 0.5% DMSO by oral gavage at a dosage of 10 mg/kg b.w. and were sacrificed 1, 2, 4 h after gavage. A fourth group of mice was sacrificed immediately after gavage for the baseline control. For sacrifice, mice were

anesthetized by IP injection of pentobarbital (35 mg/kg) and blood was collected by cardiac puncture with heparinized syringes. Plasma and small intestine mucosa (duodenum and jejunum) were collected.

II.6. 4-Hydroxy-2-alkenals: derivatization, analysis and quantification

4-hydroxy-2-alkenals were derivatized from 400 μ l of basolateral media of Caco-2/TC7 or from 300 μ l of plasma as described previously (18). Deuterated 4-HNE and 4-HHE (20 ng) used as internal standards were added to the samples. Briefly, they were treated with O-2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl hydroxylamine hydrochloride. After acidification with H₂SO₄, pentafluorobenzoyloxime derivatives were extracted with methanol and hexane. The hydroxyl group was then converted into trimethylsilylether after an overnight treatment with *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide at room temperature. The pentafluorobenzoyloxime trimethylsilylether derivatives of 4-HHE (O-PFB-TMS-4-HHE) and 4-HNE (O-PFB-TMS-4-HNE) were then analyzed by GC-MS using negative ion chemical ionization (NICI) mode on a Hewlett-Packard quadripole mass spectrometer interfaced (18) with a Hewlett-Packard gas chromatograph (Les Ullis, France).

II.7. IL-6 and MCP-1 measurements

IL-6 and MCP-1 (Clinisciences, France) were assayed by ELISA kit according to the manufacturer's instructions.

II.8. Plasma triacylglycerols and NEFA measurements

Plasma triacylglycerols (TAG) were measured with the triglyceride PAP kit (BioMérieux France) as previously described (19). Plasma TAG concentration was calculated by subtracting the free glycerol in plasma measured with the glycerol UV-method (R-Biopharm/Boehringer, Mannheim, Germany). Plasma NEFA was measured using NEFA-C kit (Wako Chemicals, Neuss, Germany) (19).

II.9. Fatty acid analysis

Total lipids were extracted from 35 μ L of plasma as described previously (19). The organic phase was evaporated under N_2 and total fatty acids were transesterified using boron trifluoride in methanol (BF_3 /methanol) (19). The FA methyl esters were then analyzed by GC using a DELSI instrument model DI 200 equipped with a fused silica capillary SP-2380 column (60 m x 0.22 mm). Heptadecanoic acid (C17:0, Sigma, France) was used as an internal standard.

II.10. Quantification of free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides in oil mixtures

Thiobarbituric acid–MDA adducts were separated using a method adapted from different authors (20, 21) by HPLC and measured by fluorimetry using an external calibration curve (excitation 535 nm, emission 555 nm). Hydroperoxides were quantified in lipid blends according to a method adapted from Nourooz-Zahed et al (22).

II.11. Quantitative PCR Analysis

Total RNA was extracted from Caco-2/TC7, duodenum, jejunum and ileum of mice using the NucleoSpin[®] RNA/Protein kit (Macherey Nagel, Duren, Germany). cDNAs were synthesized from 1 μ g of total RNA in the presence of 100 units of Superscript II (invitrogen) with a mixture of random hexamers and oligo (dt) primers (Promega, Charbonnières, France). The amount of target mRNAs was measured by RT, followed by real-time PCR, using a Rotor-Gene Q (Qiagen, France). The amount of target mRNAs was measured by RT, followed by real-time PCR, using a Rotor-Gene Q (Qiagen, France). Primer sequence and RT-quantitative PCR conditions are available upon request (cyrille.debard@univ-lyon1.fr). Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) mRNA level and TATA-box Binding Protein (TBP) mRNA were used to normalize data of duodenum, jejunum and Caco-2/TC7 cells, respectively.

II.12. Western blot analysis

Total proteins from Caco-2/TC7 and jejunum of mice were extracted with the NucleoSpin[®] RNA/Protein kit (Macherey Nagel). A total of 40 µg of protein from each sample were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. Membranes were blocked with kit reagent and incubated overnight with antibodies according to the manufacturer's recommendations. Antibodies against total NF-κB P65 and phospho-NF-κB P65 (Ser 529) were obtained from Signalways Antibody (Clinisciences, France); Phospho-IκBα (phosphoS32+S36) was from abcam (Cambridge, UK) and βactine was from Sigma, France. After incubation with secondary antibody, blots were developed with a commercial kit (WesternBreeze Chemiluminescent, Invitrogen, France). Quantification was performed by densitometry analysis of specific bands on immunoblots with Quantity One software (BioRad, Marne-la-Coquette, France).

II.13. Immunohistochemistry

Duodenal tissues were removed, fixed in 90% ethanol for 24 h at -20°C and processed into paraffin. Serial paraffin sections (4 µm) were rehydrated and endogenous peroxidase activity was quenched with 20 min incubation in 5% H₂O₂/PBS. After incubation in 2.5% normal horse blocking serum (ImpressTM, Vector), sections were incubated for 60 min at room temperature with anti-lysozyme (1/100, Zymed Laboratories) antibody diluted in blocking solution. The immune reactions were then detected by incubating with a ready-to-use peroxidase-labelled secondary reagent, ImmPRESS (MP-7401 for rabbit antibodies, Abcys, Paris, France) (30 min, room temperature). Control experiments were performed simultaneously omitting the primary antibody or incubating with preimmune rabbit serum. The sections were then counterstained and mounted.

Quantitative analysis for Paneth cells

The Paneth cell lineage was analyzed by assessing the percentage of crypt cross sections with Paneth cells (per 80 crypts). For this purpose, 4-6 sections were analyzed per mouse. A crypt was considered when it was cut along or nearly along the length of the crypt lumen (at least two-thirds of the length of the crypt). All slides were analyzed by a single investigator who was blinded to the treatment groups.

II.14. Protein carbonyl content

Protein carbonyl content was determined with an Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit from Chemicon (Hampshire, UK). The carbonyl groups in the protein chains were derivatized into dinitro-phenyl-hydrazone by reaction with dinitro-phenyl-hydrazine (DNPH) according to the manufacturer's instructions. After the derivatization of the protein sample (20 µg), one-dimensional electrophoresis was carried out on a 10% SDS-PAGE gel, proteins were transferred to PVDF membranes. After incubation with anti-DNP antibody, the blot was developed with a chemiluminescence detection system. The intensity of each line was measured and normalized by mean control levels.

II.15. Dot blot analysis

50 µg of total proteins from Caco-2/TC7 cells or from duodenum and jejunum of mice were spotted onto nitrocellulose membrane. Blocked membrane was incubated overnight with anti-HNE-adducts (Calbiochem 393207, San Diego, USA) or anti-HHE-adducts (CosmoBio N213730-EX, Tokyo, Japan) antibodies. Blots were developed with a commercial kit (WesternBreeze Chemiluminescent, Invitrogen, France). The quantification was performed by densitometric analysis of specific spots on immunoblots using Quantity One software.

II.16. Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM and were analysed using Statview 5.0 software (Abacus Concept, Berkeley). One-way ANOVA followed by Fisher PLSD was used (i) For the dietary study to compare PL, PL-ox, TG and TG-ox groups, (ii) for the gavage study, to compare plasma alkenal concentrations as a function of time and (iii) for the Caco-2 cell studies, to compare treatment effects. Two-way ANOVA followed by Fisher PLSD was used to compare oxidized *vs.* unoxidized groups globally in the dietary study (mice of oxidized groups *vs.* mice of unoxidized groups). Differences were considered significant at the $P < 0.05$ level.

III. Results

III.1. Diet compositions and biometric data

Table 2 shows that we succeeded in producing lipid mixtures containing different amounts of oxidation products, especially 4-HHE which was significantly higher in oxidized *vs* unoxidized lipid blends. MDA and hydroperoxides in oxidized oils were in a reasonable range considered as acceptable for human consumption. Noticeably, oxidation did not impact the fatty acid profile (Table 2); *n*-3 PUFA content and *n*-6/*n*-3 ratio were consistent with dietary recommendations. Mice in oxidized and unoxidized groups did not differ in final body weight gain, liver weight, white adipose tissue, plasma TAG or plasma NEFA (Table 3).

FA mg/g lipid	PL	PL-ox	TG	TG-ox
SFA	319 ±12	319 ±9	293 ±19	319 ±23
MUFA	410 ±13	413 ±7	375 ±17	372 ±23
<i>n</i> -6 PUFA	105 ±3	106 ±1	104 ±11	112 ±11
<i>n</i> -3 PUFA	18.1 ±0.4 ^a	17.9 ±0.1 ^a	22.2 ±2.8 ^b	23.4 ±2.7 ^b
Among which 18:3 <i>n</i> -3	10.6 ±0.3	10.7 ±0.1	9.4 ±0.9	10.0 ±1.3
20:5 <i>n</i> -3	0.9 ±0.3 ^a	1.1 ±0.0 ^a	2.2 ±0.3 ^b	2.4 ±0.2 ^b
22:6 <i>n</i> -3	4.3 ±0.0 ^a	3.9 ±0.0 ^a	8.8 ±1.9 ^b	8.8 ±0.9 ^b
Total PUFA	123 ±4	124 ±1	126 ±10	136 ±13
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3 ratio	7.7 ±0.5 ^b	7.4 ±0.1 ^b	5.4 ±0.2 ^a	5.5 ±0.1 ^a
Total FA	849 ±129	853 ±16	790 ±18	820 ±48
Lipid peroxidation markers				
(nmol/g of lipid blend)				
4-HHE (oxidation of <i>n</i> -3)	0.5 ±0.1 ^a	1.2 ±0.2 ^b	1.9 ±0.1 ^c	8.5 ±0.5 ^d
4-HNE (oxidation of <i>n</i> -6)	0.2 ±0.1 ^a	0.5 ±0.1 ^a	1.7 ±0.2 ^b	4.4 ±0.5 ^c
MDA	25 ±2.5 ^a	40.0 ±4.0 ^a	5.9 ±1.2 ^b	35 ±14 ^a
Hydroperoxides				
(μmol eq. H ₂ O ₂ /g lipid)	1.6 ±0.9 ^a	1.3 ±0.1 ^a	3.7 ±0.1 ^b	5.8 ±0.1 ^c

Table 2. Fatty acid composition and oxidation markers in the lipid blends. ^{a,b,c,d} Means in a row superscripted by different letters are significantly different ($P < 0.05$), Data are mean ± SEM for $n=3$. Abbreviations: FA, fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids; MDA, malondialdehyde.

Morphologic parameters	Mice groups according to dietary lipids			
	PL	PL-ox	TG	TG-ox
Biometric data				
Initial Body weight (g)	23.9 ±0.3	24.0 ±0.3	24.5 ±0.3	24.1 ±0.3
Body weight gain (g)	3.1 ±0.1	4.3 ±0.5	3.7 ±0.3	3.0 ±0.5
Energy Intake (kJ/mouse/d)	60.2 ±1.3	62.7 ±0.3	59.8 ±1.3	68.1 ±1.3 ^a
Liver weight (g)	1.21 ±0.04	1.24 ±0.06	1.27 ±0.04	1.28 ±0.05
WAT weight (g)	0.72 ±0.05	0.95 ±0.10	0.93 ±0.11	0.73 ±0.05
Plasma lipids				
Triglycerides (mM)	0.64 ±0.04	0.64 ±0.10	0.57 ±0.04	0.58 ±0.04
NEFA (mM)	0.27 ±0.01	0.32 ±0.02	0.37 ±0.02	0.28 ±0.01

Table 3. Morphologic parameters, food intake and plasma lipid concentrations of mice fed oxidized (PL-ox, TG-ox) or unoxidized (PL, TG) *n*-3 diets. ^a $P < 0.05$, ANOVA followed by Fisher test for TG-ox vs. TG. Data are mean ± SEM for $n=7-9$ per group. Abbreviations: WAT, white adipose tissue.

III.2. Aldehyde stress and inflammatory markers in plasma of mice fed oxidized *n*-3 diets

Because consuming oxidized *n*-3 diets could contribute to circulating biomarkers of lipid peroxidation such as 4-HHE and 4-HNE, we measured these 4-hydroxy-2-alkenals in plasma. Figure 1A shows a 4-fold increase of 4-HHE concentration in the plasma of oxidized groups (427 to 508 nM) vs non oxidized groups (89 to 128 nM) ($P < 0.01$). However, the concentration of 4-HNE (from *n*-6 PUFA) did not differ among groups (from 6 to 9 nM; Fig. 1B).

FA composition of total plasma lipids was characterized to test whether chronic ingestion of oxidized diet would affect PUFA metabolism. Plasma FA profile (see *Supplemental Table*) actually reflected the composition of ingested dietary fats. The proportions of *n*-3 PUFA (EPA, DHA, alpha-linolenic acid) and *n*-6 PUFA (arachidonic acid, 20:4 *n*-6; linoleic acid, 18:2 *n*-6) were similar in plasma of each oxidized and corresponding unoxidized groups. Regarding metabolic inflammation, we show higher concentrations in

plasma of the pro-inflammatory cytokine IL-6 (Fig. 1C) and of the chemokine MCP-1 (Fig. 1D) in oxidized groups.

Altogether, high-fat diet containing realistically oxidized *n*-3 PUFA induced the highest amounts of 4-HHE and of inflammatory markers in plasma. We therefore questioned whether oxidized oils would affect the small intestine, which is the primary defense line of the host regarding ingested products.

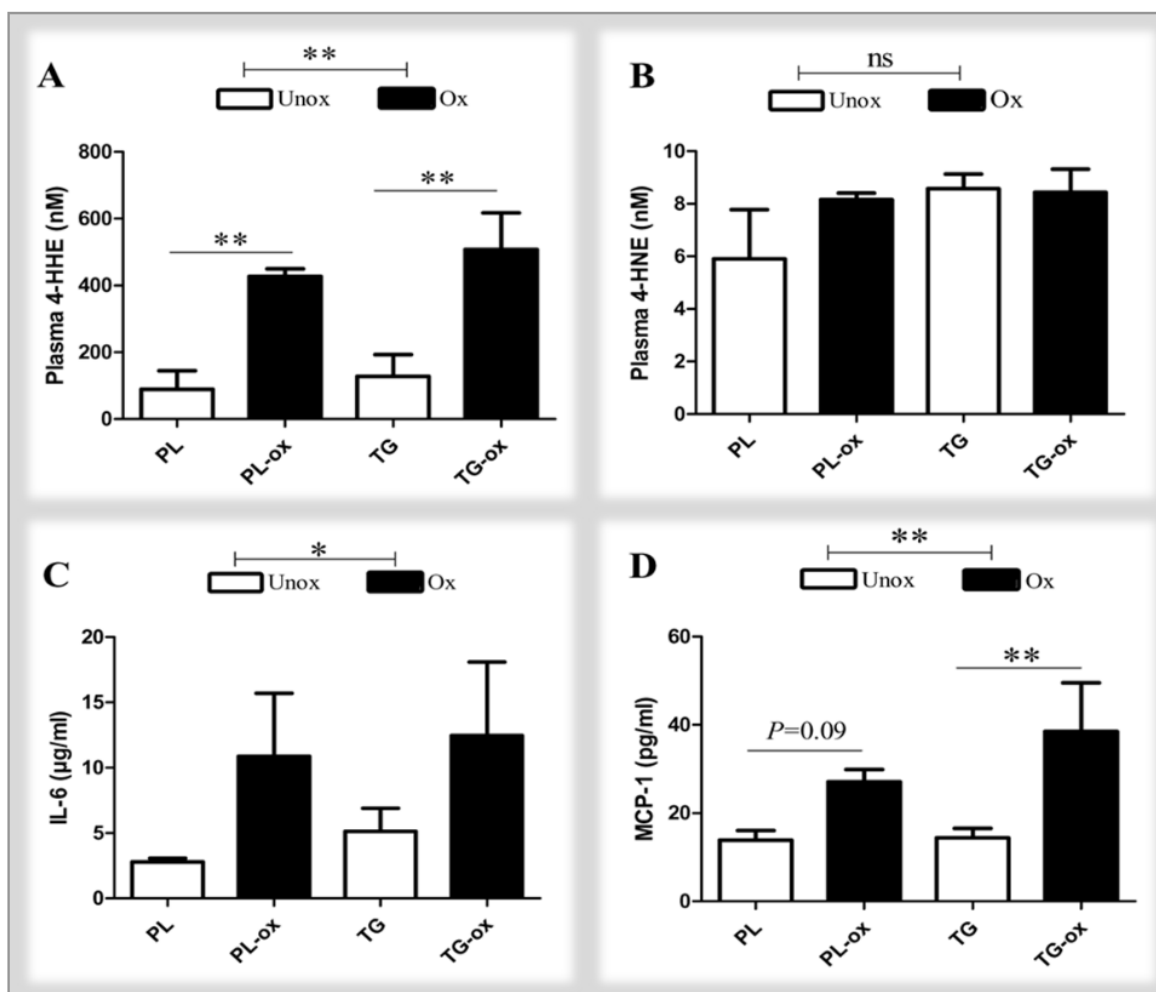


Figure 1. 4-hydroxy-hexenal (4-HHE, **A**) and 4-hydroxy-nonanal (4-HNE, **B**) concentrations and inflammatory markers, interleukin 6 (IL-6, **C**) and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1, **D**), in plasma of mice fed oxidized or unoxidized *n*-3 diets. Bars represent means \pm SEM of $n=3$ pools of 3 mice for 4-HHE and 4-HNE or $n=6-8$ for inflammatory markers. ** $P<0.01$, * $P<0.05$. ANOVA followed by Fisher test.

III.3. Effects of oxidized diets on markers of stress and inflammation in the small intestine

We analyzed the small intestine mucosa regarding the expression of genes that are known to be specifically involved in cell defense against oxidative stress and detoxification. The expression of mGPx2, a gastrointestinal glutathione peroxidase (GI-GPx) mainly expressed in the intestine, was increased specifically in the jejunum of oxidized groups (Fig. 2D, $P < 0.05$). Moreover, we examined the gene expression of two markers that are linked to endoplasmic reticulum (ER) stress. Mice fed oxidized diets exhibited a significantly higher expression of pro-survival factor glucose-regulated protein 78 (GRP78) both in the duodenum and in the jejunum (Fig. 2B; E, $P < 0.05$). The pro-apoptotic C/EBP homologous protein (CHOP) was significantly higher in the jejunum of oxidized groups (Fig. 2F). However, on the whole down in the ileum, no effects of *n*-3 PUFA oxidation was observed. Regarding inflammation, results show that the jejunum of mice fed oxidized diet exhibited an increased phosphorylation of NF- κ B P65 (Fig. 3A, $P < 0.0001$), a major transcription factor involved in inflammation, associated with a significant increase of phosphorylated I κ B α , an inhibitor NF- κ B protein (Fig. 3B, $P < 0.0001$). The activation of NF- κ B required the phosphorylation and degradation of I κ B protein that prevents the nuclear translocation of active NF- κ B. We also analyzed Paneth cells in the duodenum, which are involved in innate immunity by sensing bacteria and by discharging antimicrobial peptides including α -defensins. Paneth cell number was significantly decreased after oxidized vs unoxidized diets (Fig. 3C). Moreover, the gene expression of Lysozyme 1 produced by Paneth was decreased cells in the duodenum in the PL-ox group compared with PL group (93 ± 20 vs 315 ± 161 ; values normalized to the levels of HPRT mRNA); no differences were observed lower in the intestine in the jejunum ($15-17 \pm 2$ mRNA/HPRT regardless of oxidation) nor in the ileum ($\sim 250 \pm 100$ mRNA/HPRT regardless of oxidation).

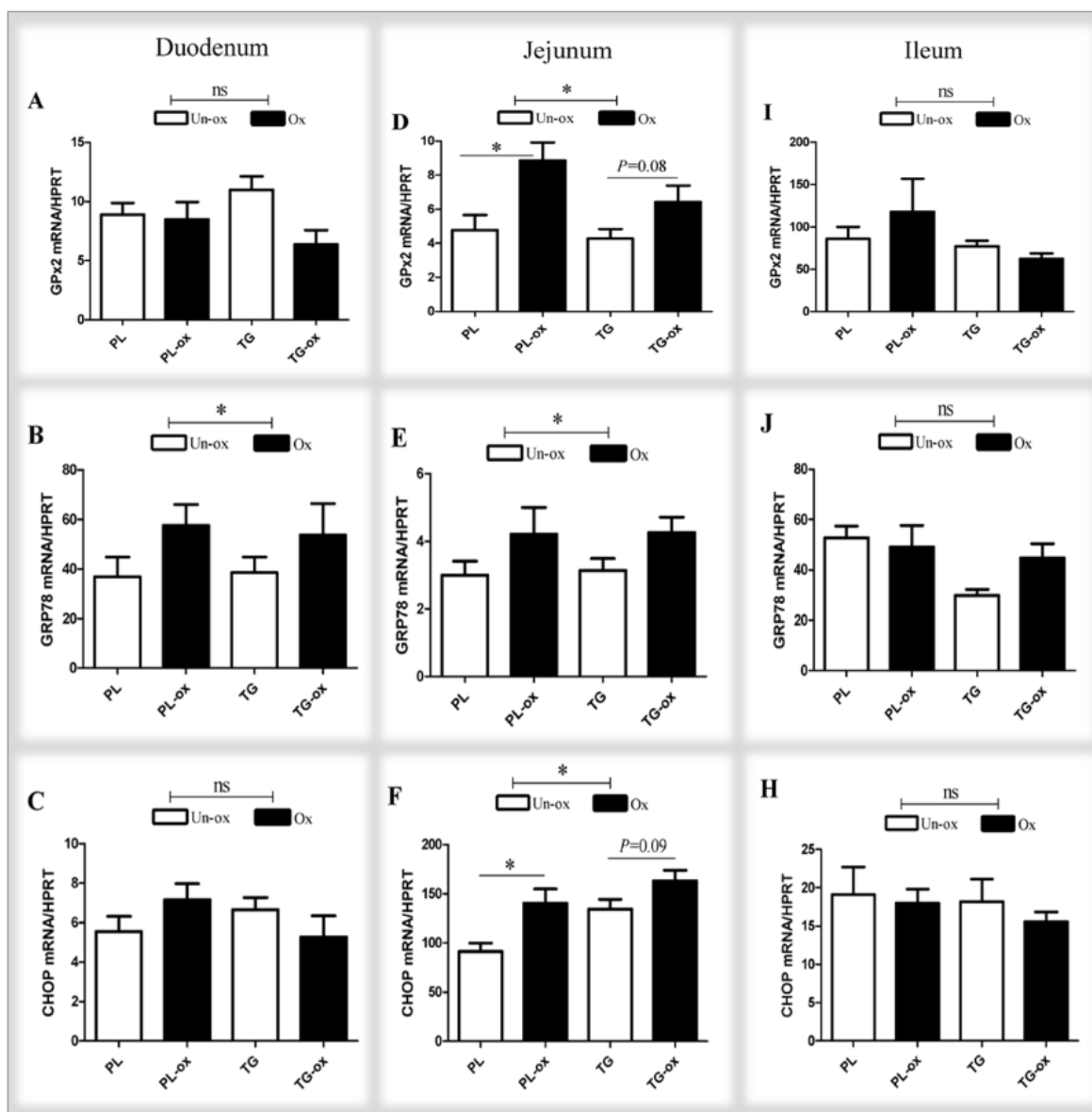
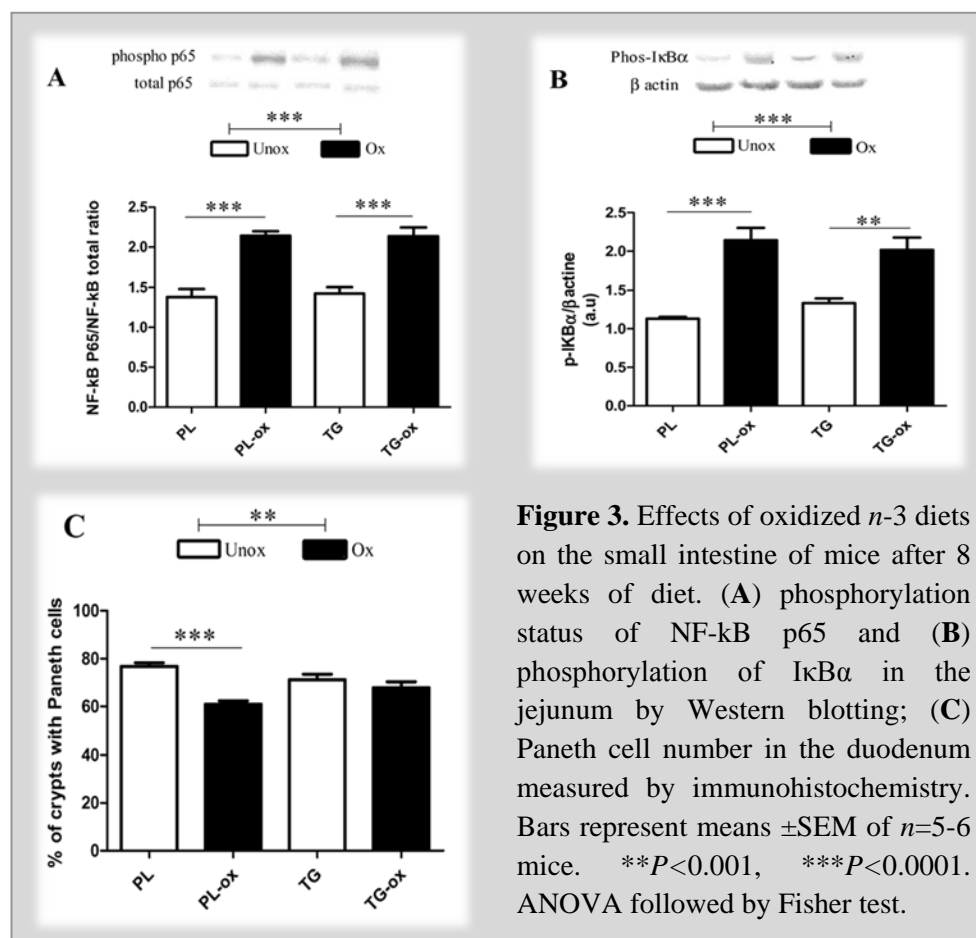


Figure 2. Gene expression of GPx2, GRP78 and CHOP in the small intestine of mice fed oxidized or unoxidized *n*-3 PUFA diets. In duodenum: **A**, GPx2; **B**, GRP78; **C**, CHOP. In jejunum: **D**, GPx2; **E**, GRP78; **F**, CHOP. In ileum: **I**, GPx2; **J**, GRP78; **H**, CHOP. This analysis was quantified by qPCR. Values are normalized to the levels of HPRT mRNA. Bars represents means \pm SEM of $n=5-7$ mice. * $P<0.05$. ANOVA followed by Fisher test.



III.4. Kinetics of intestinal absorption of 4-HHE in mice and protein modifications in the small intestine

To test the hypothesis that the increased plasma level of 4-HHE following consumption of oxidized diet could be partly explained by the absorption of 4-HHE in the small intestine we measured the levels of 4-HHE in the plasma of fasted mice after gavage with 4-HHE. Fig. 4A shows that 4-HHE intragastrically fed to mice at 88 $\mu\text{mol/kg}$ b.w. was partly absorbed after 1 h. Peak plasma concentration of 184 nM was reached 2 h after treatment ($P<0.001$ vs. baseline), corresponding to $\sim 0.1\%$ of the fed dose. Importantly, no concomitant differences were observed in the plasma levels of 4-HNE (Fig. 4B).

We further tested the formation of Michael adducts of proteins in the duodenum and jejunum. As shown in Fig. 4C& D, there were significant increases of 4-HHE protein

adducts peaked at 2 h postgavage both in the duodenum ($P < 0.001$ vs. baseline) and in the jejunum ($P < 0.05$ vs. baseline). The observed decrease in adduction at 4 h reveals the capacity of intestinal mucosa to cope with carbonyl stress. We also observed an activation of GPx2 mRNA in the duodenum 4 h after gavage with 4-HHE: 80 ± 32 vs 38 ± 12 at baseline (mRNA/HPRT, $P = 0.013$); this effect was no longer observed in the jejunum (10 ± 3 at 4h vs 9 ± 6 at baseline).

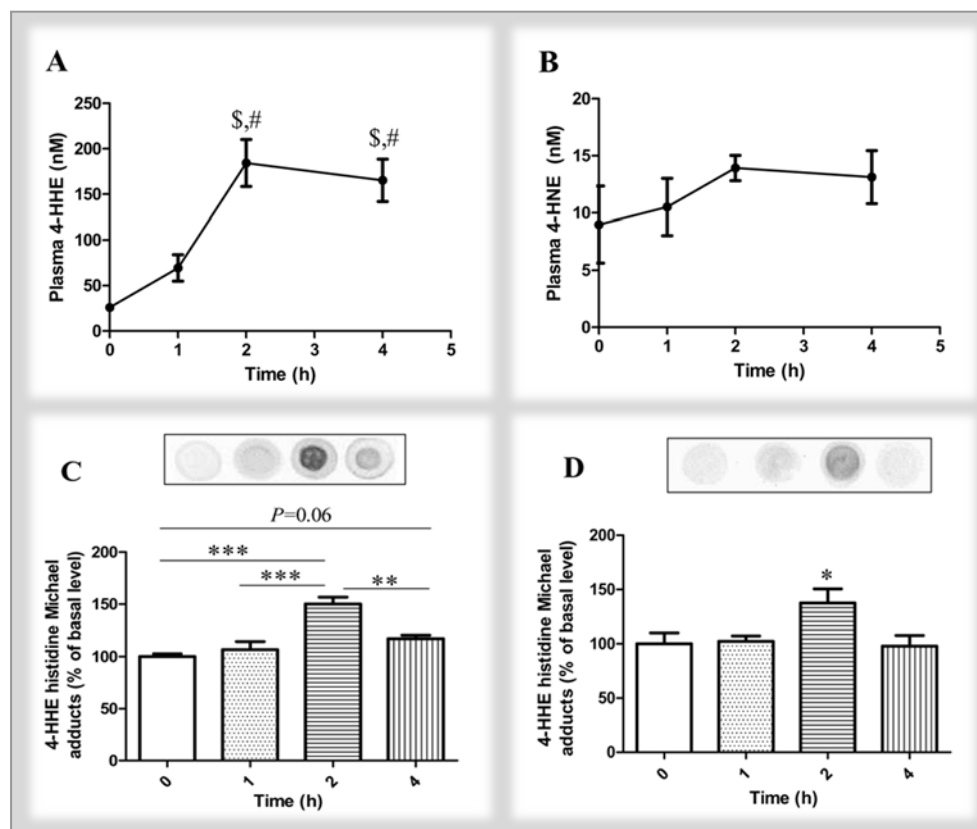


Figure 4. Plasma concentration of 4-hydroxy-hexenal (4-HHE, **A**) and 4-hydroxy-nonenal (4-HNE, **B**) and 4-HHE-protein adducts in the duodenum (**C**) and in the jejunum (**D**) in mice after oral administration of 10 mg/kg b.w of 4-HHE. Bars represent means \pm SEM of $n=4$. $^{\$}P < 0.001$ vs. baseline (0), $^{\#}P < 0.01$ vs. 1 h; $^{***}P < 0.0001$, $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$. Repeated measures ANOVA followed by Fisher test.

III.5. Absorption of 4-hydroxy-2-alkenals in vitro by Caco-2/TC7 cells

In order to further evaluate the capacity of enterocytes to absorb 4-hydroxy-2-alkenals, we incubated Caco-2/TC7 cells for 24 h with increasing concentrations of 4-HHE or 4-HNE. 4-hydroxy-2-alkenals were devoid of cytotoxic effects as checked by the absence of

leakage of lactate dehydrogenase and did not alter TEER, meaning that cell monolayer maintained its integrity (data not shown).

Fig. 5 shows that the basolateral medium (BLM) concentration of 4-HHE was significantly increased in a dose-dependent manner from 10 μM ($P < 0.01$ vs. control). Meanwhile, 4-HNE was increased from 50 μM compared with untreated cells. Detected 4-hydroxy-2-alkenals concentrations in BLM corresponded to ~ 0.2 -1% of incubated amount. Noticeably, using similar concentrations, 4-HHE was more abundant in the BLM than HNE ($P < 0.0001$).

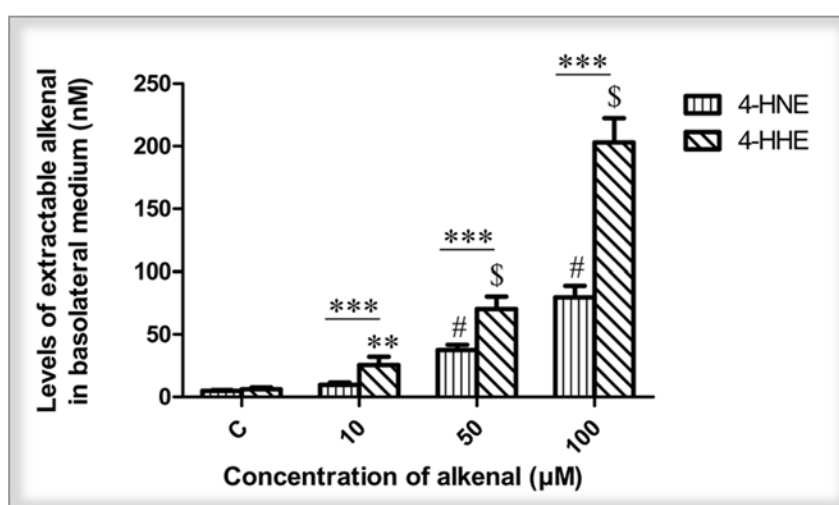


Figure 5. Concentration of 4-hydroxy-hexenal (4-HHE) and 4-hydroxy-nonenal (4-HNE) released in the basolateral medium of Caco-2/TC7 cells after treatment with increasing concentrations of 4-hydroxy-2-alkenal in the apical medium for 24 hours. Bars represent means \pm SEM of four individual experiments. *** $P < 0.0001$, $^{\$,\#} P < 0.0001$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control. ANOVA followed by Fisher test.

III.6. Protein modifications by 4-hydroxy-2-alkenals in Caco-2/TC7 cells

We quantified protein carbonylation and the formation of aldehyde-protein adducts. Cell incubated for 24 h with increasing concentrations of 4-HHE or 4-HNE exhibited an increased level of reactive carbonyl group in proteins in a dose-dependent manner from 50 μM ($P < 0.0001$) vs untreated cells (Fig. 6 A,B). Fig. 6C also reveals a significant increase of HNE-protein adducts after incubating cells for 2 h with 4-HNE from 10 μM in a dose-

dependent manner vs untreated cells. Similar treatment using 4-HHE resulted in increased amounts of HHE-protein adducts from 50 μM ($P < 0.05$) (Fig. 6D).

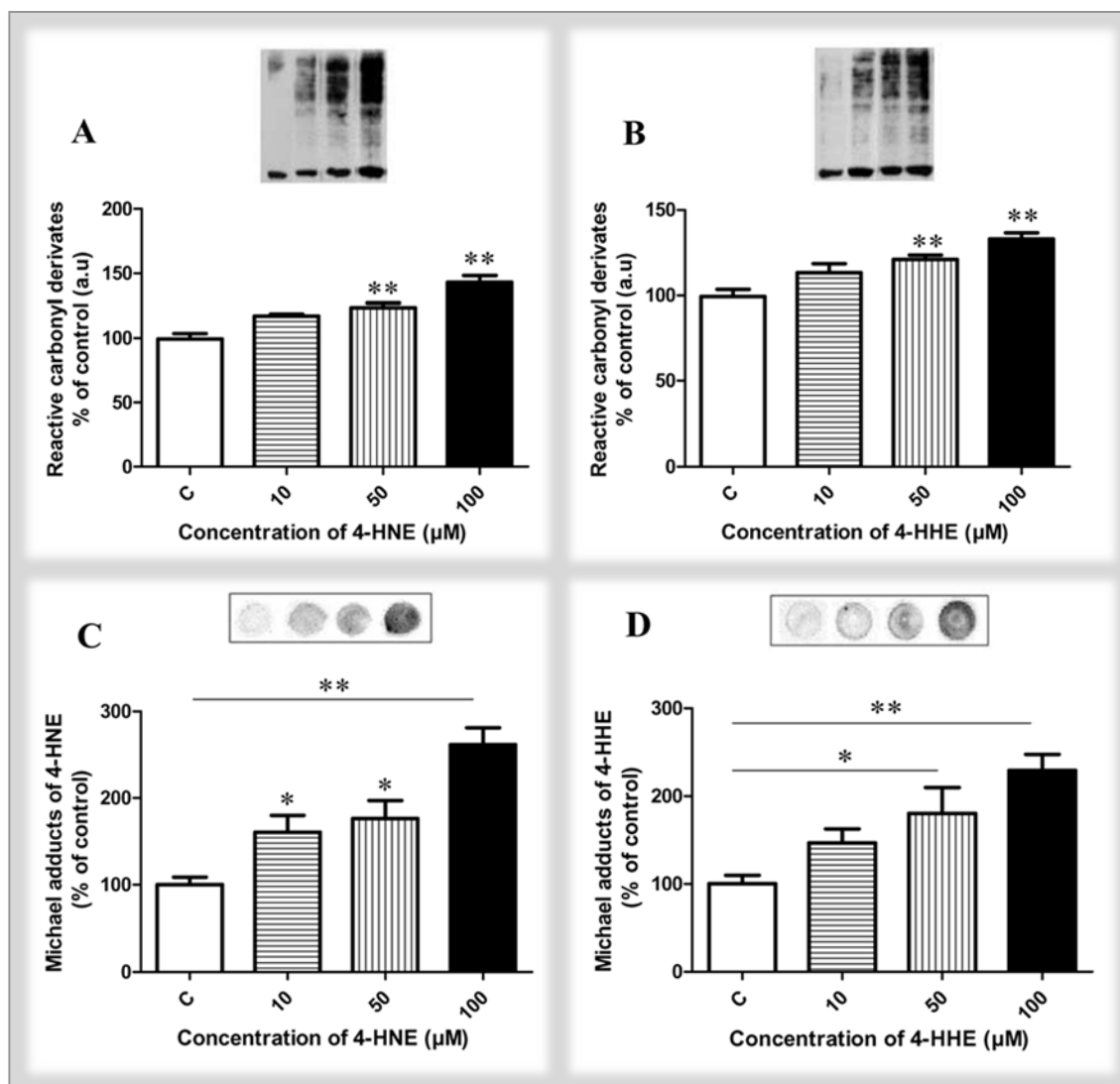


Figure 6. Densitometry analysis of protein carbonylation in the Caco-2/TC7 cells after treatment with increasing concentrations of 4-hydroxy-nonanal (4-HNE, **A**) or 4-hydroxy-hexenal (4-HHE, **B**) for 24 h. 4-HNE-protein adducts (**C**) and 4-HHE-protein adducts (**D**) in the Caco-2/TC7 cells after treatment with increasing concentrations for 2 h. Bars represent means \pm SEM of three individual experiments. ** $P < 0.01$ vs. control; * $P < 0.05$. ANOVA followed by Fisher test.

III.7. GPx2 and ER stress-linked gene expression in Caco-2/TC7 cells

We then sought to determine whether some antioxidant systems were changed due to 4-hydroxy-2-alkenals. Fig. 7 (A, B) shows that mGPx2 expression tended to increase after 24 h at 50 μ M of either 4-HNE or 4-HHE ($P=0.06$) and significantly increased at a concentration of 100 μ M ($P<0.05$) compared with control. Moreover, 4-HNE and 4-HHE (100 μ M) led to increased expression of GRP78 ($P<0.05$) (Fig. 7 C, D).

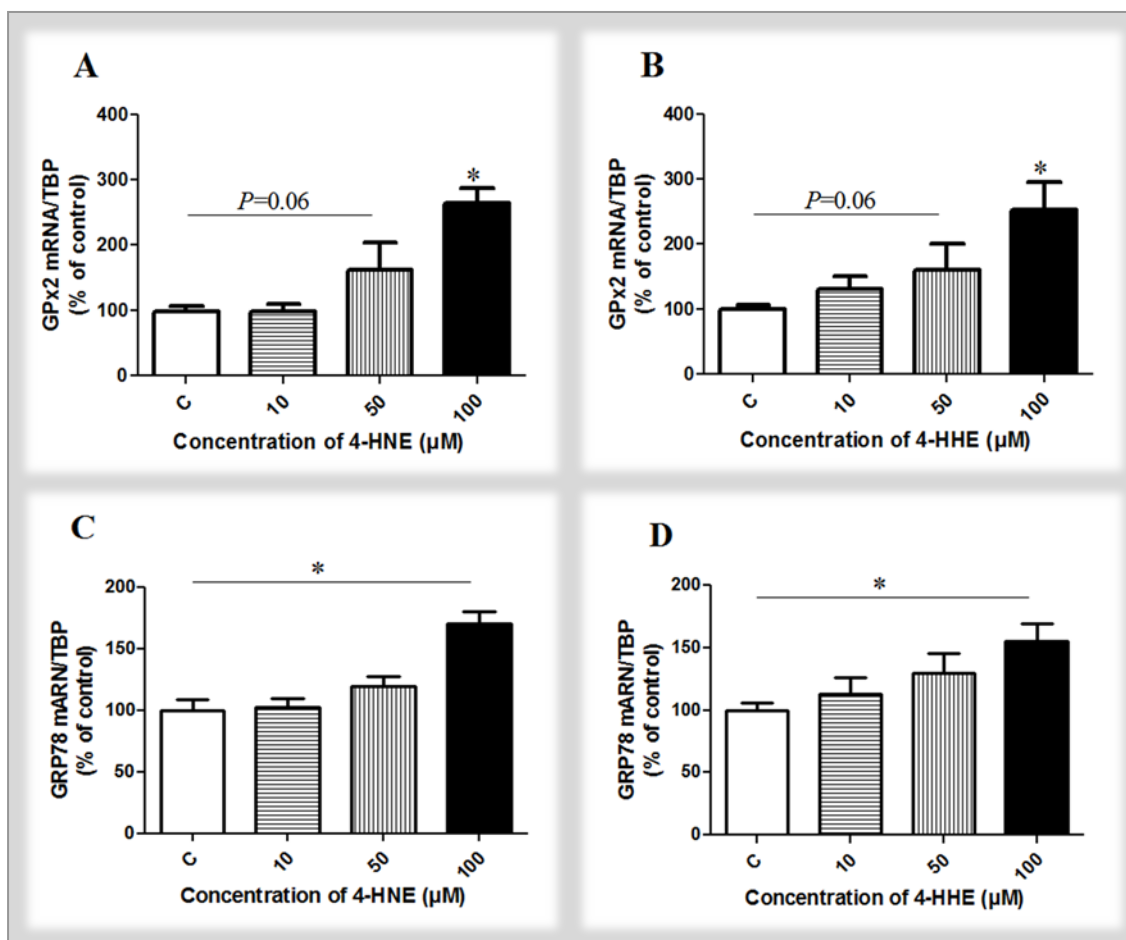


Figure 7. Effect of increasing concentrations of 4-hydroxy-nonenal (4-HNE) or 4-hydroxy-hexenal (4-HHE) on GPx2 (A, B) and GRP78 (C, D) mRNA expression in Caco-2/TC7 cells after 24 h of treatment. This analysis was quantified by qPCR. Bars represent means \pm SEM of three individual experiments. Values are normalized to the levels of TBP mRNA and expressed as relative amount compared with untreated cells. * $P<0.05$ vs. control. ANOVA followed by Fisher test.

IV. Discussion

This study is the first to highlight the effects of dietary oxidized *n*-3 PUFA after ingestion on several markers of oxidative stress and inflammation. We tested the hypotheses that a long-term intake of limited amounts of oxidized *n*-3 PUFA, chosen to mimic oxidized *n*-3 levels that can be encountered in foodstuffs, enhances markers of oxidative stress and inflammation in mice, partly due to intestinal absorption of 4-HHE.

We show for the first time that the plasma concentration of 4-HHE, a marker of *n*-3 PUFA lipid peroxidation (23), was increased after chronic intake of oxidized *n*-3 PUFA. In lipid mixtures, the level of 4-HHE was higher in oxidized oils compared to unoxidized oils; We therefore propose the possibility of a partial intestinal absorption of 4-HHE contained in the diet. Results indeed show that gavage with 4-HHE increased transiently the plasma concentration of 4-HHE in mice. The increase of plasma 4-HHE may be attributed to absorption of exogenously fed 4-HHE; while keeping in mind that a deduction on the bioavailability of 4-HHE cannot be made from the present study due to the lack of deeper pharmacokinetic data. *In vitro*, Caco-2 cell study confirms that up to 1% of the amount of 4-HHE incubated can be absorbed despite its high reactivity within cells. Moreover, lower amounts of 4-HNE than 4-HHE were found in BLM suggesting that 4-HNE is less absorbed by the intestine. Of note, 4-HNE is more lipophilic than 4-HHE (23), which could explain its lower absorption and its lower abundance in plasma. A 2.8-fold higher level of plasma 4-HHE was observed in the diet study (TG-ox diet, 8 nmol of 4-HHE ingested per day as measured in lipid mixture) compared with acute gavage (single oral 4-HHE intake, 13.2 nmol). 4-HHE may thus partly accumulate in plasma after long-term dietary intake.

Regarding the clinical relevance of plasma 4-HHE concentrations observed in this study, limited data is available about the concentration of 4-HHE in human blood in relation to diet. Indeed, in healthy men supplemented with gradually increasing doses of DHA up to 1600 mg per day during 8 weeks, a concomitant increase in plasma 4-HHE was observed from 1 ng/mL to 11 ng/mL; i.e., concentrations of ~100 nM at the end of the 8 week dietary period (24). In our study, the animals were fed during 8 weeks with diets enriched in *n*-3 PUFA, resulting in similar plasma 4-HHE concentrations; i.e. ~90 nM in PL group and ~120 nM in TG group. Therefore, the plasma 4-HHE level after feeding unoxidized *n*-3 PUFA containing diets is of a similar order to those reported by Calzada et al. Moreover, they demonstrated that high DHA supplementation (between 800 and 1600 mg/day),

causes a significant increase in plasma levels of 4-HHE. This was attributed by the authors to the *in vivo* generation of oxidative stress due to DHA accumulation in the body (24). According to our results, we raise the question of whether this may be due to some degree of DHA oxidation occurring during the preparation and storage of oil capsules. Thus, our new results demonstrates for the first time that intestinal absorption of 4-hydroxy-2-alkenals can occur both *in vivo* and *in vitro* and that moderate and realistic PUFA oxidation can significantly increase the plasma 4-HHE concentration.

Regarding the practical relevance of dietary origin of oxidation products in humans, few studies to date measured the concentrations of 4-hydroxy-2-alkenals in foodstuff. Surh et al. reported that the Korean daily exposure to 4-hydroxy-2-alkenals was 14 nmol/day for 4-HHE and 17 nmol/day for 4-HNE (25). In our study, the quantity of ingested 4-HHE per day as the one measured in lipid mixtures of high-fat diets was in the range 1-8 nmol/day. This is slightly lower than in Surh et al. study (25), nevertheless our experimental conditions were relevant considering realistic food intakes.

Most of the biological effects of 4-hydroxy-2-alkenals are due to their capacity to react with the nucleophilic sites of proteins to form Michael or Schiff base protein adducts (13, 26), which can be implicated in several diseases such as diabetes (27), atherosclerosis (28) and neurodegenerative diseases (14, 16). Here we found that when 4-HHE was orally administrated to mice, it reacted with functional proteins to form adducts in the duodenum and to a lower extent in the jejunum. Our *in vitro* studies confirm this adduction on absorptive cells. Because the implication of the intestinal barrier in the development of metabolic diseases has been recently revealed (29), the metabolic impact of intestinal alterations by dietary oxidation products deserves further exploration.

To date, the link between the quality of dietary PUFA, *n-6 vs n-3*, and inflammation has been largely studied but little is known about the contribution of PUFA oxidation in inflammation. We show here that the oxidized *n-3* PUFA diet induced higher IL-6, MCP-1 in plasma and activation of transcription factor NF- κ B in intestinal mucosa than unoxidized diet. Because the NF- κ B pathway is implicated in the regulation of genes involved in inflammation (30), altogether our results suggest a link between oxidized *n-3* PUFA and metabolic inflammation. Moreover, among cell lineages in the intestine, Paneth cells are involved in innate immune defense and their depletion or a reduced expression of the Paneth cell defensin HD5 and HD6 is reported in several pathologies (31-33). Importantly, we show for the first time that dietary oxidized lipids induce a decrease in Paneth cell number in the duodenum. This decrease of Lyz-1 expression, marker of Paneth

cells, is confined to the duodenum. Our results raise the question of whether this effect could have contributed to the increase of the systemic inflammation.

In the GI tract, a defense system is known to detoxify and degrade lipid peroxidation products (34) and protect against inflammation (35), such as gastrointestinal glutathione peroxidase. Feeding animals with highly oxidized *n*-6 fat was reported to increase the expression of markers of intestine antioxidant defense (36, 37). Here we show a significant increase in GPx2 mRNA after incubation of Caco-2 cells with 4-HHE or 4-HNE, in the jejunum of mice fed moderately oxidized diet and in the duodenum of mice directly force-fed with 4-HHE. Interestingly, in the force-fed mice, GPx2 expression was highest in the intestinal segment presenting the greater amount of protein adducts. Thus, the intake of oxidized PUFA, or some of their components such as 4-hydroxy-2-alkenals, affects the antioxidant defense system. GPx2 appears here to reflect the activation of a metabolic path for detoxifying 4-hydroxy-2-alkenals and adducts, either generated in the gut or introduced *via* the diet.

GRP78 is widely considered as a common regulator/sensor of ER stress. Overexpression of GRP78 is induced by a variety of environmental stress conditions leading to impairment of essential ER functions in order to maintain cell viability against oxidative stress and apoptosis (38). In addition, ER stress induces genes encoding non ER-proteins such as CHOP associated with growth arrest and induction to apoptosis (39). ER stress may also result from protein denaturation due to carbonylation and/or covalent adducts formation with 4-hydroxy-2-alkenals. We demonstrate for the first time the implication of oxidized PUFA or their end-products in ER-stress in the upper GI (duodenum and jejunum) through induction of GRP78 and CHOP expressions. It is important to note that the effects of oxidized lipids on the stress markers are different along the intestine with a most significant effect in the jejunum regardless of oil type. Further investigations are needed to clarify the possible interactions between inflammation and ER-stress in the different segments of the intestine in response to oxidized lipids. On the other hand, the expression of GRP78 was reported to increase under conditions of chronic inflammation in the intestine including active Crohn's disease and ulcerative colitis (40). In our study, observed up-regulation of GPx2 and GRP78 can be associated with (i) protein adducts and further activation of NF- κ B and (ii) induction of a protective mechanism against oxidative stress and inflammation. The increase of NF- κ B activation is consistent with published data. Indeed, Shkoda et al. demonstrated that the increased level of GRP78 induces the activation of NF- κ B through the phosphorylation of IKK complex in the intestinal

epithelial cells (40). Furthermore, Je et al. showed that the activation of NF- κ B by 4-HHE can occur via NIK/IKK and p38 MAPK pathway in the endothelial cells (41).

In the present study, PL-ox lipid blend contained lower detectable amounts of 4-HHE than TG-ox lipid blend. However, both types of oxidized *n*-3 PUFA-containing diets resulted in significant metabolic effects of similar magnitude, especially regarding plasma inflammation and stress markers in the jejunum. This suggests that inflammatory responses are not a simple reflection of the content of *n*-3 PUFA either in the diet or in the plasma, or of the dietary 4-HHE content. We cannot rule out that observed effects can be due to other bioactive species than 4-hydroxy-alkenals. For example, oxidized phospholipids by themselves have been reported to be proinflammatory (42, 43); advanced oxidation protein products could also contribute to observed effects (44, 45).

In conclusion, our study demonstrates in mice that long-term ingestion of oxidized *n*-3 PUFA induces an accumulation of 4-HHE in plasma, which can be partly due to 4-HHE absorption in the small intestine. Furthermore, oxidized *n*-3 PUFA enhance inflammatory markers in plasma and ER stress in the upper small intestine and reduce Paneth cell number in the duodenum, possibly through the biological reactivity of 4-HHE. GPx2 appears to be required to defend against injury by oxidative stress markers and prevent inflammation in the intestine. The up-regulation of GPx2 and GRP78 can be considered as an attempt to counteract increased inflammation and oxidative stress, noticed by the formation of Michael adducts and reactive carbonyls on intestinal proteins. Altogether, we highlight that the potential harmful effects of dietary oxidized *n*-3 PUFA should be taken into account in several pathologies. Particularly, it appears of utmost importance in medical and nutritional practice to formulate and handle *n*-3 PUFA-rich foods or supplements with care to avoid PUFA oxidation. This can be particularly relevant in patients suffering from acute or chronic diseases, who increase their *n*-3 PUFA intake because of their reported health benefits.

V. References

1. Hotamisligil, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **444**: 860-867.
2. Manabe, I. 2011. Chronic inflammation links cardiovascular, metabolic and renal diseases. *Circ J* **75**: 2739-2748.
3. Zulet, M. A., B. Puchau, C. Navarro, A. Marti, and J. A. Martinez. 2007. Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies. *Nutr Hosp* **22**: 511-527.
4. Fedor, D., and D. S. Kelley. 2009. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **12**: 138-146.
5. Fetterman, J. W., Jr., and M. M. Zdanowicz. 2009. Therapeutic potential of n-3 polyunsaturated fatty acids in disease. *Am J Health Syst Pharm* **66**: 1169-1179.
6. Parra, D., N. M. Bandarra, M. Kiely, I. Thorsdottir, and J. A. Martinez. 2007. Impact of fish intake on oxidative stress when included into a moderate energy-restricted program to treat obesity. *Eur J Nutr* **46**: 460-467.
7. Carpentier, Y. A., L. Portois, and W. J. Malaisse. 2006. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* **83**: 1499S-1504S.
8. Simopoulos, A. P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* **233**: 674-688.
9. Tanito, M., R. S. Brush, M. H. Elliott, L. D. Wicker, K. R. Henry, and R. E. Anderson. 2009. High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration. *J Lipid Res* **50**: 807-819.
10. Esterbauer, H., R. J. Schaur, and H. Zollner. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* **11**: 81-128.
11. Guichardant, M., S. Bacot, P. Moliere, and M. Lagarde. 2006. Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **75**: 179-182.
12. Bacot, S., N. Bernoud-Hubac, B. Chantegrel, C. Deshayes, A. Doutheau, G. Ponsin, M. Lagarde, and M. Guichardant. 2007. Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxy-alkenals. *J Lipid Res* **48**: 816-825.

13. Guichardant, M., P. Taibi-Tronche, L. B. Fay, and M. Lagarde. 1998. Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* **25**: 1049-1056.
14. Bradley, M. A., S. Xiong-Fister, W. R. Markesbery, and M. A. Lovell. 2012. Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression. *Neurobiol Aging* **33**: 1034-1044.
15. Mattson, M. P. 2009. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp Gerontol* **44**: 625-633.
16. Shibata, N., S. Yamada, K. Uchida, A. Hirano, S. Sakoda, H. Fujimura, S. Sasaki, M. Iwata, S. Toi, M. Kawaguchi, T. Yamamoto, and M. Kobayashi. 2004. Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* **1019**: 170-177.
17. Soulere, L., Y. Queneau, and A. Doutheau. 2007. An expeditious synthesis of 4-hydroxy-2E-nonenal (4-HNE), its dimethyl acetal and of related compounds. *Chem Phys Lipids* **150**: 239-243.
18. Michalski, M. C., C. Calzada, A. Makino, S. Michaud, and M. Guichardant. 2008. Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk--a preliminary study. *Mol Nutr Food Res* **52**: 1478-1485.
19. Lefils, J., A. Geloën, H. Vidal, M. Lagarde, and N. Bernoud-Hubac. 2010. Dietary DHA: time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *Br J Nutr* **104**: 1304-1312.
20. Mendes, R., C. Cardoso, and C. Pestana. 2009. Measurement of malondialdehyde in fish: a comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chem* **112**: 1038-1045.
21. Seljeskog, E., T. Hervig, and M. A. Mansoor. 2006. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem* **39**: 947-954.
22. Nourooz-Zadeh, J., J. Tajaddini-Sarmadi, and S. P. Wolff. 1994. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* **220**: 403-409.
23. Riahi, Y., G. Cohen, O. Shamni, and S. Sasson. 2010. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**: E879-E886.

24. Calzada, C., R. Colas, N. Guillot, M. Guichardant, M. Laville, E. Vericel, and M. Lagarde. 2010. Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. *Atherosclerosis* **208**: 467-472.
25. Surh, J., S. Lee, and H. Kwon. 2007. 4-hydroxy-2-alkenals in polyunsaturated fatty acids-fortified infant formulas and other commercial food products. *Food Addit Contam* **24**: 1209-1218.
26. Uchida, K. 2003. Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino Acids* **25**: 249-257.
27. Pillon, N. J., R. E. Vella, L. Souleere, M. Becchi, M. Lagarde, and C. O. Soulage. 2011. Structural and functional changes in human insulin induced by the lipid peroxidation byproducts 4-hydroxy-2-nonenal and 4-hydroxy-2-hexenal. *Chem Res Toxicol* **24**: 752-762.
28. Uchida, K., S. Toyokuni, K. Nishikawa, S. Kawakishi, H. Oda, H. Hiai, and E. R. Stadtman. 1994. Michael addition-type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry* **33**: 12487-12494.
29. Catalioto, R. M., C. A. Maggi, and S. Giuliani. 2011. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions. *Curr Med Chem* **18**: 398-426.
30. Lawrence, T., D. W. Gilroy, P. R. Colville-Nash, and D. A. Willoughby. 2001. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. *Nat Med* **7**: 1291-1297.
31. Hodin, C. M., F. J. Verdam, J. Grootjans, S. S. Rensen, F. K. Verheyen, C. H. Dejong, W. A. Buurman, J. W. Greve, and K. Lenaerts. 2011. Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals. *J Pathol* **225**: 276-284.
32. Koslowski, M. J., J. Beisner, E. F. Stange, and J. Wehkamp. 2010. Innate antimicrobial host defense in small intestinal Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* **300**: 34-40.
33. Schaart, M. W., A. C. de Bruijn, D. M. Bouwman, R. R. de Krijger, J. B. van Goudoever, D. Tibboel, and I. B. Renes. 2009. Epithelial functions of the residual bowel after surgery for necrotising enterocolitis in human infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **49**: 31-41.

34. Wingler, K., C. Muller, K. Schmehl, S. Florian, and R. Brigelius-Flohe. 2000. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology* **119**: 420-430.
35. Esworthy, R. S., L. Yang, P. H. Frankel, and F. F. Chu. 2005. Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *J Nutr* **135**: 740-745.
36. Olivero David, R., S. Bastida, A. Schultz, L. Gonzalez Torres, M. J. Gonzalez-Munoz, F. J. Sanchez-Muniz, and J. Benedi. 2010. Fasting status and thermally oxidized sunflower oil ingestion affect the intestinal antioxidant enzyme activity and gene expression of male Wistar rats. *J Agric Food Chem* **58**: 2498-2504.
37. Varady, J., K. Eder, and R. Ringseis. 2011. Dietary oxidized fat activates the oxidative stress-responsive transcription factors NF-kappaB and Nrf2 in intestinal mucosa of mice. *Eur J Nutr* **50**: 601-609.
38. Ni, M., Y. Zhang, and A. S. Lee. 2011. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J* **434**: 181-188.
39. Oyadomari, S., and M. Mori. 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **11**: 381-389.
40. Shkoda, A., P. A. Ruiz, H. Daniel, S. C. Kim, G. Rogler, R. B. Sartor, and D. Haller. 2007. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. *Gastroenterology* **132**: 190-207.
41. Je, J. H., J. Y. Lee, K. J. Jung, B. Sung, E. K. Go, B. P. Yu, and H. Y. Chung. 2004. NF-kappaB activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. *FEBS Lett* **566**: 183-189.
42. Greig, F. H., S. Kennedy, and C. M. Spickett. 2011. Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation. *Free Radic Biol Med* **52**: 266-280.
43. Tseng, W., J. Lu, G. A. Bishop, A. D. Watson, A. P. Sage, L. Demer, and Y. Tintut. 2010. Regulation of interleukin-6 expression in osteoblasts by oxidized phospholipids. *J Lipid Res* **51**: 1010-1016.
44. Unoki, H., H. Bujo, S. Yamagishi, M. Takeuchi, T. Imaizumi, and Y. Saito. 2007. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract* **76**: 236-244.

-
45. Zhou, Q. G., M. Zhou, A. J. Lou, D. Xie, and F. F. Hou. 2010. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response and insulin resistance in cultured adipocytes via induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Physiol Biochem* **26**: 775-786.
46. Chiang, Y. F., H. M. Shaw, M. F. Yang, C. Y. Huang, C. H. Hsieh, and P. M. Chao. 2011. Dietary oxidised frying oil causes oxidative damage of pancreatic islets and impairment of insulin secretion, effects associated with vitamin E deficiency. *Br J Nutr* **105**: 1311-1319.

Supplemental table:

Fatty acid profile in plasma in mice fed with oxidized (PL-ox, TG-ox) or unoxidized (PL, TG) *n*-3 diets.

Major FA in plasma				
Total FA (mol/100 mol FA):	PL	PL-ox	TG	TG-ox
14:0	0.4 ±0.0	0.4 ±0.0	0.4 ±0.0	0.3 ±0.1
16:0	21.5 ±0.8	23.0 ±1.0	22.7 ±0.8	22.9 ±0.6
18:0	12.3 ±0.2	12.3 ±1.1	12.0 ±0.4	11.8 ±0.4
SFA	34.4 ±1.3	36.6 ±4.9	36.1 ±2.6	35.7 ±0.3
16:1 <i>n</i> -7	1.2 ±0.02	1.4 ±0.2	1.6 ±0.4	1.3 ±0.2
16:1 <i>n</i> -9	0.4 ±0.0	0.4 ±0.0	0.5 ±0.1	0.4 ±0.0
18:1 <i>n</i> -7	1.3 ±0.1	1.2 ±0.2	1.4 ±0.3	0.9 ±0.6
18:1 <i>n</i> -9	16.1 ±1.9	16.5 ±2.1	13.4 ±6.7	15.2 ±0.7
20:1 <i>n</i> -9	0.3 ±0.1	0.3 ±0.1	Tr	0.3 ±0.0
24:1 <i>n</i> -9	0.3 ±0.0	0.2 ±0.1	0.3 ±0.0	0.3 ±0.1
MUFA	19.5 ±0.2	20.3 ±2.2	17.3 ±6.7	18.2 ±0.6
18 :2 <i>n</i> -6	26.1 ±0.4	25.0 ±0.9	26.4 ±0.8	25.5 ±1.1
20 :2 <i>n</i> -6	0.3 ±0.0	0.3 ±0.0	0.3 ±0.0	0.2 ±0.0
20 :3 <i>n</i> -6	1.1 ±0.1	1.2 ±0.1	1.4 ±0.1	1.2 ±0.1
20 :4 <i>n</i> -6	11.2 ±0.5	9.6 ±0.3	9.5 ±0.8	9.4 ±0.7
<i>n</i>-6	39.2 ±1.0	36.5 ±2.5	38.2 ±3.2	36.8 ±1.4
18 : 3 <i>n</i> -3	0.3 ±0.0	0.2 ±0.0	Tr	0.2 ±0.0
20 :5 <i>n</i> -3	0.7 ±0.0	0.8 ±0.0	1.2 ±0.1	1.3 ±0.1
22 :5 <i>n</i> -3	0.3 ±0.0	0.3 ±0.0	0.3 ±0.0	0.3 ±0.0
22 :6 <i>n</i> -3	4.9 ±0.3 ^a	4.8 ±0.3 ^a	6.6 ±0.5 ^b	7.0 ±0.4 ^b
<i>n</i>-3	6.4 ±0.2 ^a	6.4 ±0.5 ^a	8.4 ±1.3 ^b	9.2 ±1.2 ^b
PUFA	45.6 ±2.6	42.9 ±2.7	46.5 ±4.3	46.0 ±0.4
<i>n</i>-6/<i>n</i>-3 ratio	6.1 ±0.2 ^a	5.7 ±0.2 ^a	4.6 ±0.4 ^b	4.1 ±0.6 ^b

^{a,b} Means in a row that do not share a common letter are significantly different ($P < 0.05$). Data are mean ±SEM for $n=4-6$ per group, Tr: traces. Abbreviations: FA, fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids.

CHAPITRE V

Résultats complémentaires

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié *in vitro* quelques effets des 4-hydroxy-alkénals sur le stress oxydant cellulaire. Cette partie a pour but de compléter les résultats liés au stress oxydant et d'évaluer pour la première fois les effets des 4-hydroxy-alkénals sur la lipogénèse intestinale.

I. Effets des 4-hydroxy-alkénals sur le stress oxydant et l'inflammation

I.1. Effet des 4-hydroxy-alkénals sur la production de ROS

Le traitement par les 4-hydroxy-alkénals altère la structure des protéines cellulaires ce qui suggère une altération du fonctionnement des cellules. La production d'espèces radicalaires oxygénées induit un stress dans la cellule pouvant aboutir à des perturbations de la structure des protéines. Nous avons donc étudié l'effet de ces 4-hydroxy-alkénals sur la production d'espèces radicalaires oxygénées à court et à long temps. Nous avons montré une augmentation de la production de ROS intracellulaires après 30 minutes et 24 heures d'incubation des cellules. En effet, le traitement des cellules avec 100 μM de 4-HNE ou de 4-HHE pendant 30 minutes a entraîné une augmentation de la production de ROS de 130% et 128% respectivement comparé aux conditions contrôles (**Figure 1A, 1D**). En revanche, nous n'avons pas observé d'augmentation après 2 heures de traitement (**Figure 1B, 1E**). Ceci suggère que les cellules intestinales seraient capables d'inhiber la production de ROS par des mécanismes de défense cellulaire anti-oxydante. Après 24 heures d'incubation, nous avons retrouvé une augmentation significative de la production de ROS à forte dose d'alkénals (**Figure 1C, 1F**) et ce dans le même ordre de grandeur qu'après 30 minutes d'incubation. Nos résultats montrent ainsi que les 4-hydroxy-alkénals pourraient jouer un rôle puissant dans l'induction du stress oxydant *via* la production de ROS.

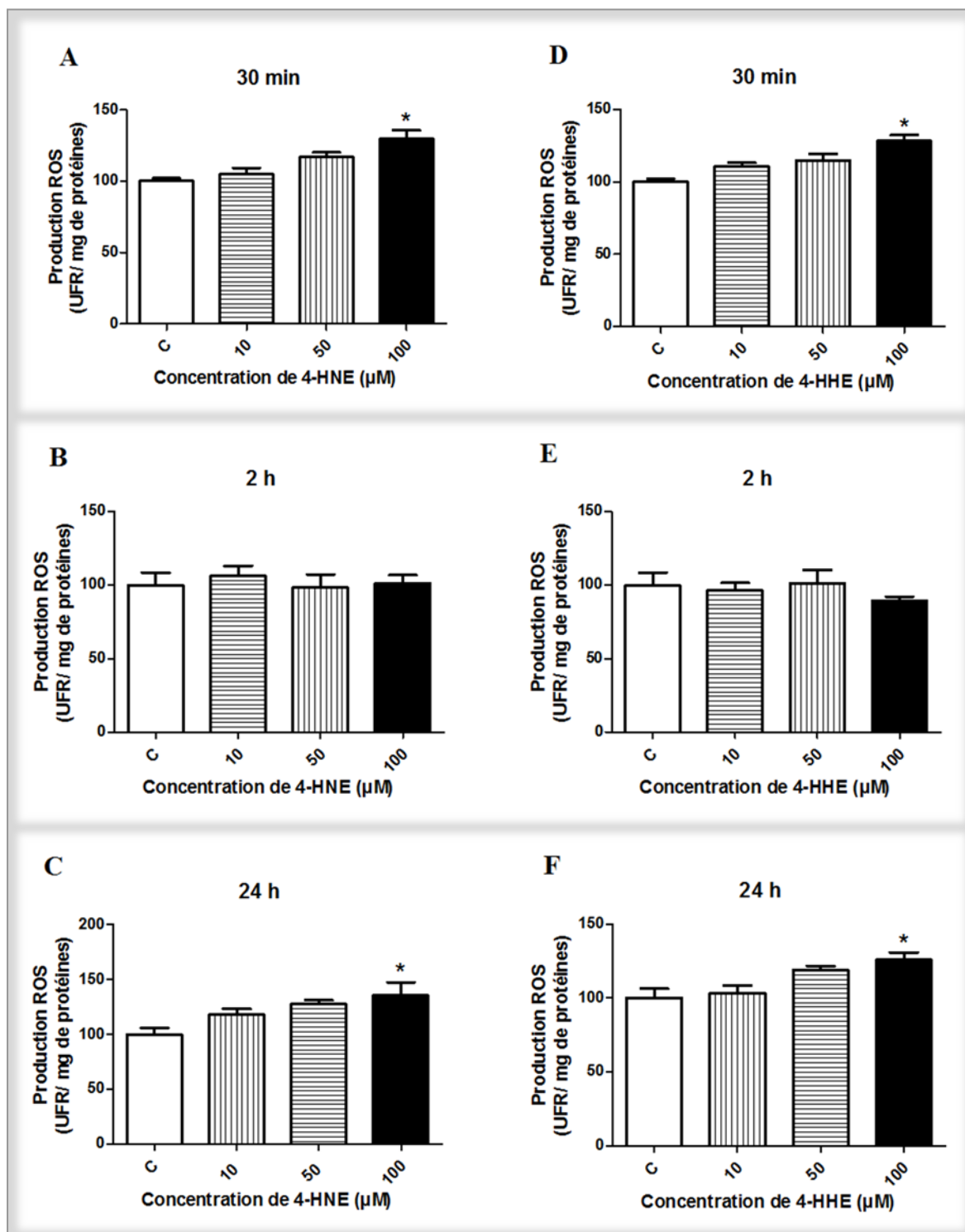


Figure 1 : Production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) par le 4-HNE ou le 4-HHE. Les cellules Caco-2/TC7 sont incubées en présence de concentrations croissantes de 4-HNE ou de 4-HHE pendant 30 minutes (A, D), 2 heures (B, E) et 24 heures (C, F). La production de ROS a été mesurée à l'aide du DCFDA comme expliqué dans la partie « matériels & méthodes ». Les résultats sont des moyennes \pm SEM. $n=3$, $*P<0,05$.

I.2. Effets des 4-hydroxy-alkénals sur l'autophagie

Les résultats précédents sur l'implication des 4-hydroxy-alkénals dans la génération du stress oxydant cellulaire (production des ROS, carbonylation des protéines et formation des adduits covalents) suggèrent qu'une forte exposition des cellules aux 4-hydroxy-alkénals induit un processus d'autophagie qui permet aux cellules de survivre au stress. Cette autophagie est notamment marquée par la présence de protéines endommagées. L'observation en microscopie électronique à transmission montre la présence de cellules autophagiques après traitement avec 100 μM de 4-HNE ou de 4-HHE pendant 30 minutes et 24 heures.

L'observation en MET montre également des structures vacuolaires, appelées autophagosomes, délimitées par une double membrane après exposition des cellules aux 4-hydroxy-alkénals pendant 30 minutes et 24 heures. Ces vacuoles emprisonnent une partie du matériel cytoplasmique ainsi que des organites, tels que les mitochondries et le RE (**Figure 2**).

A l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur l'implication des produits d'oxydation des AGPI dans l'autophagie. Récemment, une étude a montré une activation de l'autophagie dans les cellules musculaires lisses vasculaires après incubation de ces cellules avec des concentrations $\geq 50 \mu\text{M}$ de 4-HNE pendant 30 minutes. Celle-ci était associée avec la formation d'adduits covalents (Hill, Haberzettl et al. 2008). Selon les auteurs, ces résultats suggèrent que l'induction de l'autophagie pourrait être une réponse mise en place pour protéger les cellules des conséquences d'une forte peroxydation lipidique

D'autres données ont mis en évidence que les ROS peuvent induire l'autophagie dans certaines conditions. Dans notre étude, nous avons effectivement observé que le 4-HHE et le 4-HNE incubés à une concentration initiale élevée mais au final comparable à la littérature suite à la capture d'une partie des alkénals par les éléments du milieu de culture DMEM, induisent un stress oxydant cellulaire en augmentant la production de ROS intracellulaires et que ceci est associé à l'induction de l'autophagie. Ainsi, nos résultats sont cohérents avec les données de la littérature (Huang, Lam et al. 2011).

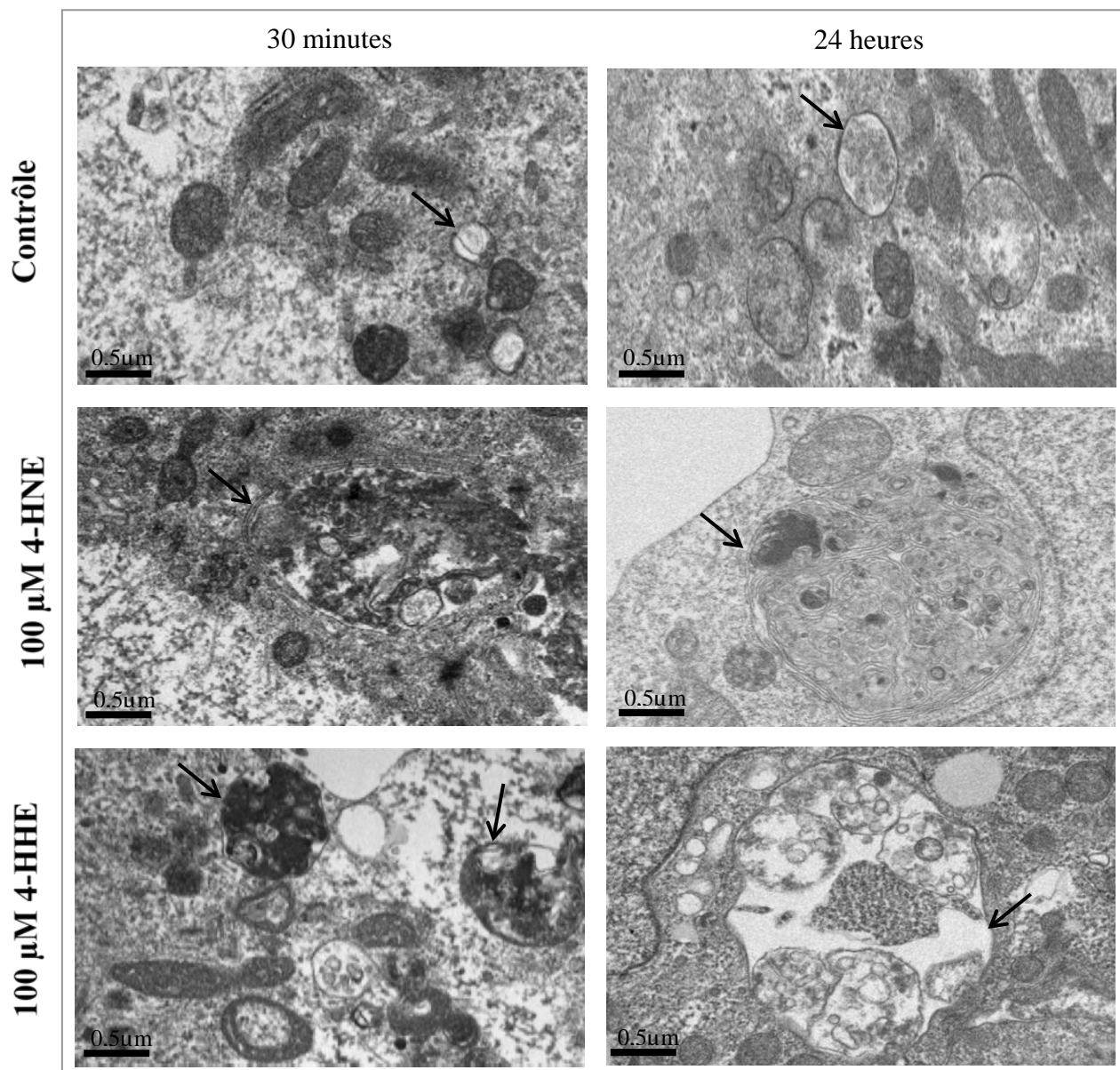


Figure 2 : Observation en microscopie électronique à transmission (MET) de cellules autophagiques après traitement des Caco-2/TC7 avec de 4-HNE ou de 4-HHE. Les cellules Caco-2/TC7 sont incubées en présence de 100 μ M de 4-HNE ou de 4-HHE pendant 30 minutes et 24 heures puis fixées par le complexe glutaraldéhyde/cacodylate.

I.3. Effet des 4-hydroxy-alkénals sur NFκB

L'augmentation du stress oxydant intestinal par les 4-hydroxy-alkénals pourrait être un facteur de déclenchement et d'entretien de l'inflammation intestinale. Nous avons donc étudié la voie d'activation de NF-κB, un facteur de transcription pro-inflammatoire. Malgré l'augmentation du stress oxydant, nous constatons une absence de signe d'inflammation. En effet, la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF-κB dans le noyau n'augmente pas en réponse au 4-HNE (**Figure 3B**) ni au 4-HHE (**Figure 3D**), tout comme la phosphorylation d'IκB cytoplasmique (**Figure 3A et 3C** respectivement), ce qui signifie que NF-κB est encore lié à IκB et n'a pas migré vers le noyau pour activer les gènes de l'inflammation.

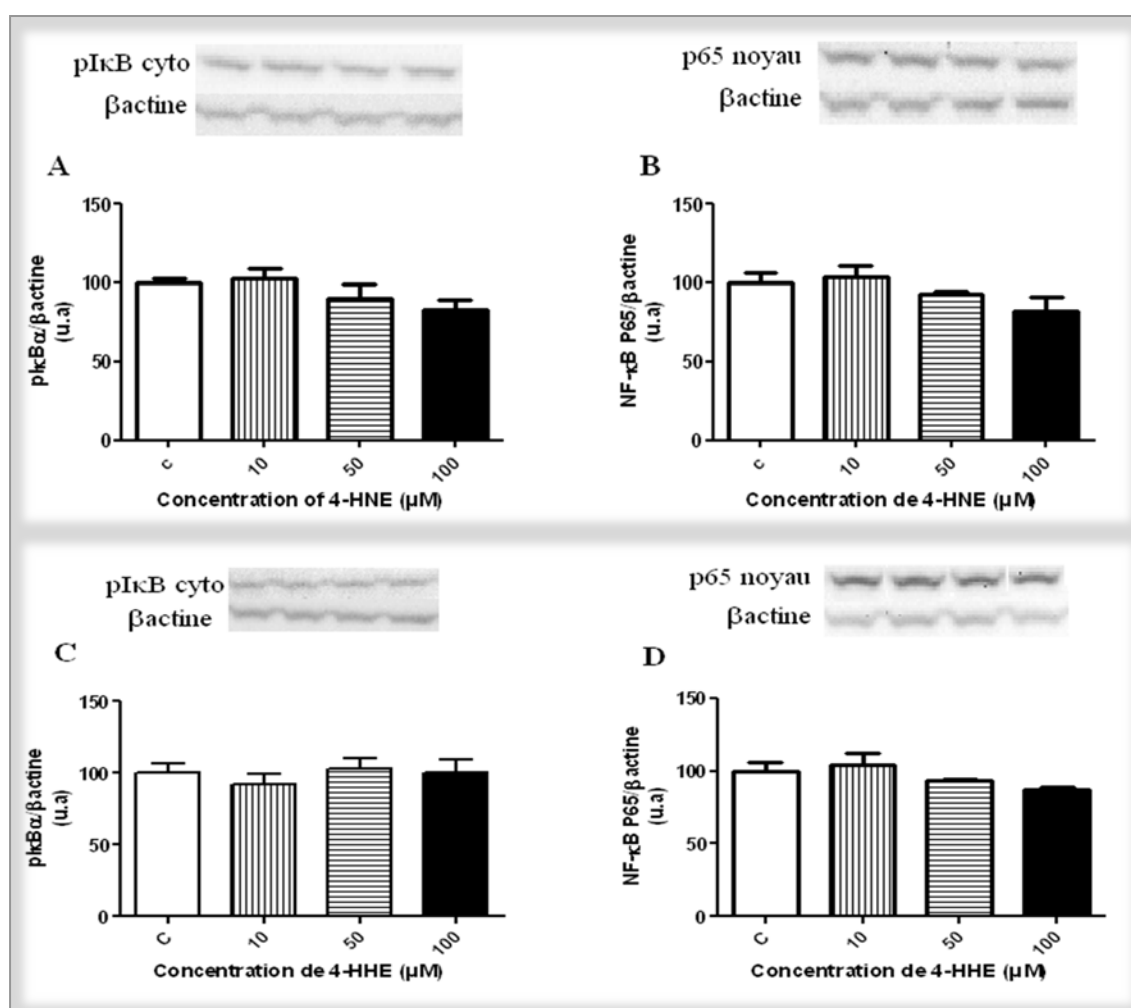


Figure 3 : Effet de 4-HNE et de 4-HHE sur la voie d'activation de NF-κB. Les Caco-2/TC7 sont traitées avec de doses croissantes de 4-HNE ou de 4-HHE pendant 24 heures. Les protéines nucléaires et cytoplasmiques sont extraites comme décrites dans « matériels & méthodes » et analysées par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques de la phosphorylation d'IκB (A, C) et de NF-κB P65 (B, D). Les valeurs sont normalisées par la β actine et exprimées en % du contrôle. Les résultats sont des moyennes ± SEM. n=4.

Dans la littérature, les effets des alkénals sur l'activation de la voie de NF- κ B sont peu décrits et sont parfois contradictoires. En effet, Je et al. ont montré une activation de NF- κ B *via* l'activation du complexe IKK après incubation de cellules endothéliales avec 30 μ M de 4-HHE durant 4 heures (Je, Lee et al. 2004). Une autre étude réalisée sur des cellules musculaires lisses a détecté une liaison de NF- κ B au niveau de l'ADN nucléaire après incubation avec 1 μ M de 4-HNE pendant 6 heures (Ruef, Moser et al. 2001). En revanche, d'autres études ont rapporté l'effet inhibiteur des alkénals sur l'activation de NF- κ B, en particulier après incubation des cellules avec des LPS (Hattori, Hattori et al. 2001; Kim, Park et al. 2009). Les auteurs expliquent ce fait par la formation d'adduits au niveau des récepteurs des LPS, ce qui modifie leur conformation et par la suite inhibe l'effet potentiel des LPS sur l'induction de l'inflammation.

Dans notre présente étude, les 4-hydroxy-alkénals n'induisent pas l'activation de la voie NF- κ B et par conséquent l'inflammation dans les entérocytes. Différents facteurs pourraient expliquer ces résultats : le temps d'incubation, les concentrations d'alkénals ou encore l'activation de défenses antioxydantes (GPx2,...). Il serait intéressant de réaliser des analyses complémentaires afin de mieux comprendre comment les alkénals agissent les voies de l'inflammation au niveau intestinal.

II. Effets des 4-hydroxy-alkénals sur la lipogénèse

Nous avons complété nos travaux par une étude sur les effets des 4-hydroxy-alkénals sur le métabolisme lipidique. Pour cela, nous avons incubé des cellules Caco-2/TC7 pendant 24 heures avec des micelles lipidiques mimant les micelles duodénales.

II.1. Dosage des 4-hydroxy-alkénals dans le milieu basolatéral

Dans le chapitre précédent, nous avons mesuré la quantité des alkénals sécrétés dans le milieu basolatéral par GC/MS après traitement pendant 24 heures avec du 4-HHE ou du 4-HNE seul. Nous avons également voulu évaluer l'impact de la présence des micelles lipidiques sur l'absorption de ces alkénals. Nos résultats montrent qu'après incubation des cellules avec 100 μ M de 4-HNE ou de 4-HHE incorporé dans des micelles une partie de ces alkénals est retrouvée dans le milieu basolatéral. Ceci témoigne de la capacité des cellules à absorber les

alkénals. Le 4-HNE et le 4-HHE sont tous deux présents dans le milieu basolatéral, cependant la quantité détectée de 4-HHE est plus importante que celle de 4-HNE (**Figure 4**). Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans le chapitre IV.

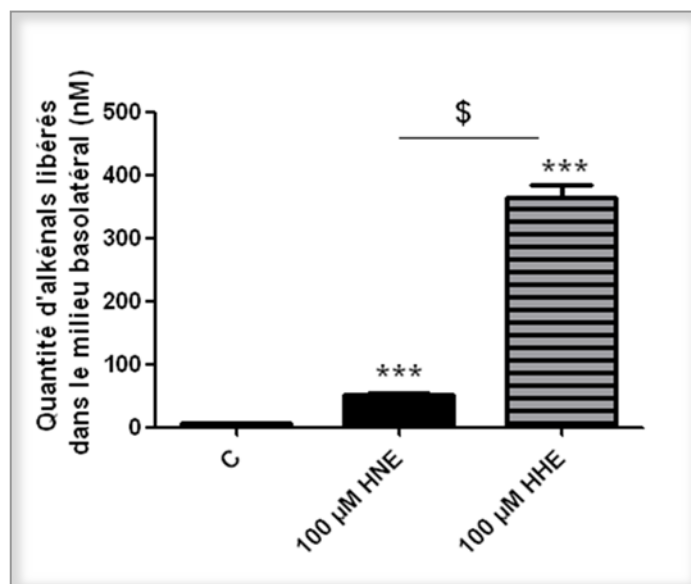


Figure 4 : Concentration de 4-HHE et de 4-HNE dans le milieu basal (nM). Les cellules Caco-2/TC7 sont traitées pendant 24 h avec 100 µM de 4-HHE ou de 4-HNE contenant des micelles mixtes lipidiques (dont 0,5 mM d'acide oléique). Les résultats sont des moyennes \pm SEM. $n=4$, *** $P<0,0001$ vs C; \$ $P<0,0001$.

II.2. Activation de l'ACC par les 4-hydroxy-alkénals

Les alkénals étant absorbés par les cellules intestinales, nous nous sommes intéressés à leur impact sur les voies de lipogénèse entérocytaire. L'acétyl-coenzyme A carboxylase est une enzyme qui catalyse la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, un substrat essentiel à la synthèse des acides gras. Cette enzyme est étroitement régulée par son niveau de phosphorylation. Ainsi, elle n'est active que lorsqu'elle est non phosphorylée. Nous avons étudié l'activation de l'enzyme ACC après incubation des cellules pendant 24 heures avec des micelles lipidiques contenant 100 µM de 4-HHE ou de 4-HNE. **Figure 5 (A et B)** montre que le traitement avec les micelles d'alkénals induit une activation de l'enzyme ACC (forme non phosphorylée) de 30 % (4-HNE) et de 40 % (4-HHE).

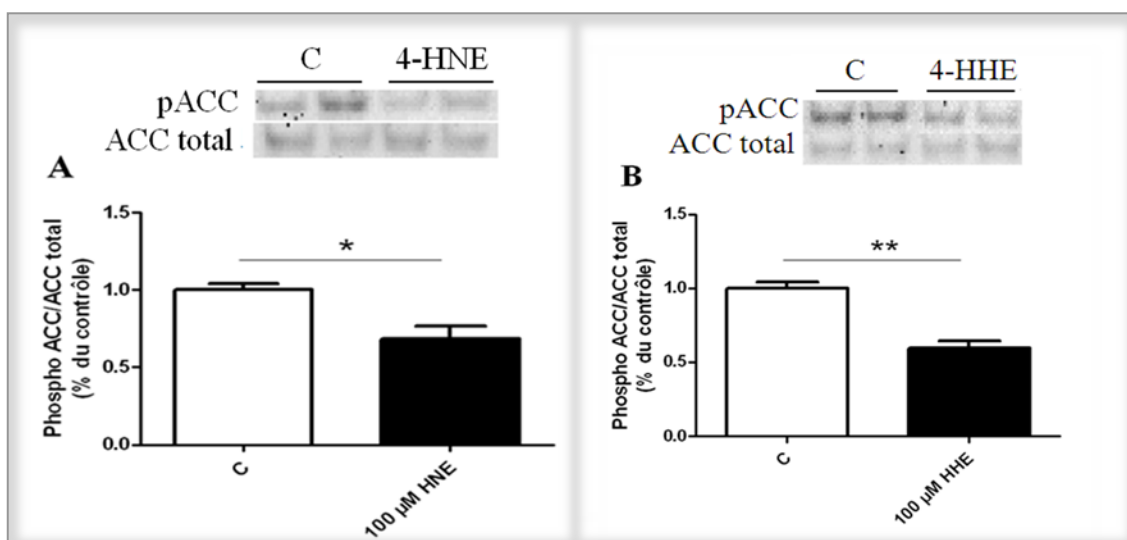


Figure 5 : Activation de la protéine acétyl-coenzyme A carboxylase (pACC/ACC) par le 4-HNE et le 4-HHE. Les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre sont incubées avec les micelles lipidiques (acide oléique : 0,5 mM) en présence de 100 μM de 4-HNE (A) ou de 100 μM de 4-HHE (B) pendant 24 heures. Les protéines cellulaires sont extraites et analysées par western blot en utilisant un anticorps spécifique phospho-serine 79. Les résultats sont normalisés par la quantité totale d'ACC et exprimés en % du contrôle. Les résultats sont des moyennes ± SEM. n=4, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Récemment, il a été montré que le traitement des nématodes *C.elegans* avec du 4-HNE augmente la synthèse des AG suite à l'augmentation des niveaux de malonyl-CoA et induit ainsi une accumulation de lipides dans ce modèle de manière-dose dépendante (Singh, Niemczyk et al. 2009). Le mécanisme proposé par les auteurs était que le 4-HNE entrerait dans les mitochondries et formerait des adduits covalents avec les protéines intervenant dans le cycle de Krebs. Ceci inhiberait le cycle de Krebs augmentant ainsi la biodisponibilité des citrates. Ces derniers seraient ensuite convertis en acétyl-CoA, substrat de la synthèse du malonyl-CoA catalysé par l'ACC. Nos résultats confirment l'implication des alkénals dans l'activation de la synthèse des AG. Des études complémentaires seraient intéressantes à mener pour mieux comprendre l'impact de l'oxydation des AGPI sur l'augmentation de la synthèse des lipides.

II.3. Effets des 4-hydroxy-alkénals sur la lipémie

II.3.1. Synthèse d'Apo B-48

L'apolipoprotéine B-48 est une protéine essentielle à l'assemblage et à la sécrétion des lipoprotéines riches en TG. La quantité d'Apo B-48 définit le nombre des particules qui seront formées et sécrétées (une particule de chylomicron ne contient qu'une seule Apo B-48).

Nos résultats montrent qu'une co-incubation de 24 heures avec des micelles lipidiques et 100 μ M de 4-HHE ou de 4-HNE entraîne une augmentation de 25 % de l'expression protéique de l'Apo B-48 dans les cellules Caco-2/TC7 par rapport au contrôle stimulé avec des micelles lipidiques seules (**Figure 6 A et B**).

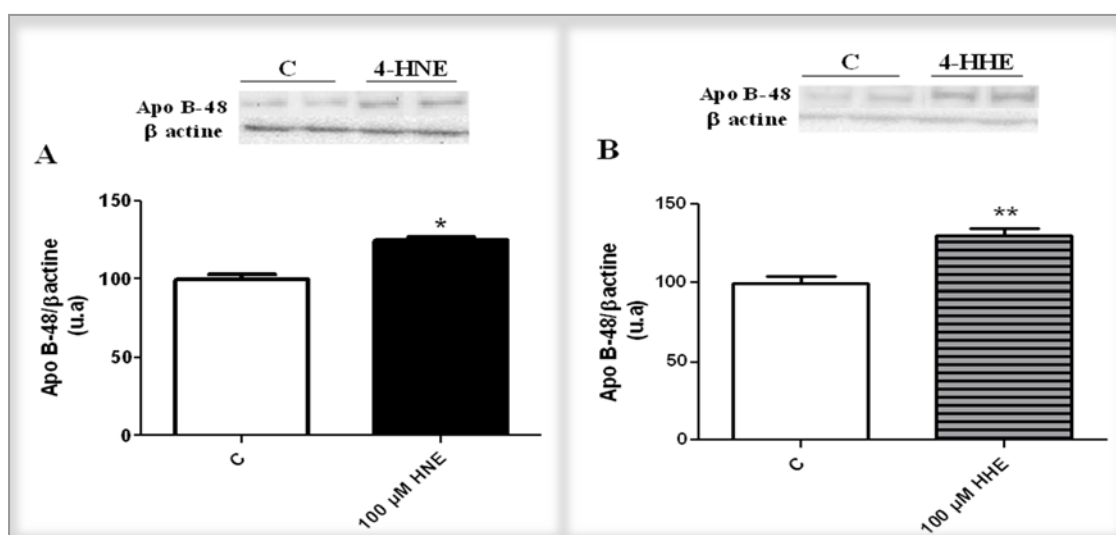


Figure 6 : Activation de la protéine apolipoprotéine B-48 (Apo B-48) par le 4-HNE et le 4-HHE. Les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre sont incubées avec les micelles lipidiques (acide oléique : 0,5 mM) en présence de 100 μ M de 4-HNE (A) ou de 100 μ M de 4-HHE (B) pendant 24 heures. Les protéines cellulaires sont extraites et analysées par western blot en utilisant un anticorps Apo B. Les résultats sont normalisés par la β actine et exprimés en % du contrôle. Les résultats sont des moyennes \pm SEM. n=4, * P <0,05; ** P <0,01.

II.3.2. Sécrétion des triglycérides dans le milieu basolatéral

Suite aux résultats précédents, nous avons dosé la quantité des triglycérides sécrétés par les cellules Caco-2/TC7 dans le milieu basolatéral après 24 heures de traitement avec les micelles contenant l'un ou l'autre des 4-hydroxy-alkénals. Nous avons montré que la sécrétion de triglycérides est significativement augmentée en présence des 4-hydroxy-alkénals. Cette augmentation est de l'ordre de 40 % en réponse au 4-HNE (**Figure 7A**) et de 50 % en présence de 4-HHE (**Figure 7B**). Ces résultats sont cohérents avec ceux concernant l'activation de l'Apo B-48.

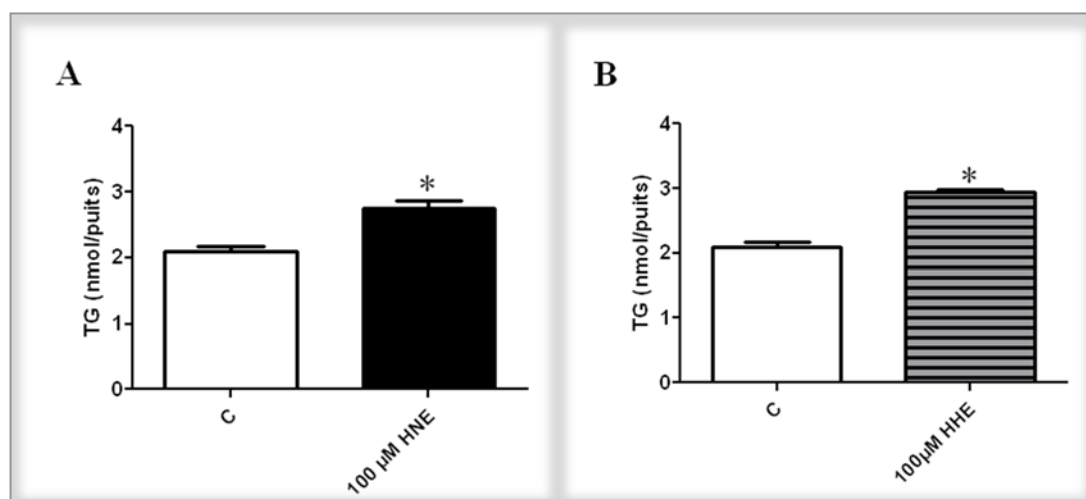


Figure 7 : Augmentation de la sécrétion des triglycérides (TG) dans le milieu basal des Caco-2/TC7 par le 4-HNE et le 4-HHE. Les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre sont incubées avec les micelles lipidiques (acide oléique : 0,5 mM) en présence de 100 µM de 4-HNE (A) ou de 100 µM de 4-HHE (B) pendant 24 heures. Les milieux basaux sont collectés et les TG sont dosés en suivant les instructions du kit enzymatique. Les résultats sont des moyenne \pm SEM et exprimés en nmol/puits. Moyenne \pm SEM. n=4, *P<0,05.

Cependant, une relation entre le taux plasmatique élevé du 4-HHE et la dyslipémie réputée en cas de l'obésité et de diabète pourrait être établie. En effet, une étude réalisée par une équipe de notre laboratoire a démontré que la concentration de 4-HHE est plus élevée dans le plasma des sujets diabétiques par rapport à celle des sujets normaux (Pillon 2010). Ceci suggère un rôle possible de ces alkénals dans la dyslipémie chez les sujets diabétiques.

II.3.3. Effet des 4-hydroxy-alkénals sur la taille des chylomicrons

La taille des chylomicrons est l'un des facteurs régulateurs du métabolisme post-intestinal des chylomicrons. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés pour la première fois aux effets des alkénals sur ce paramètre. Nous avons observé que le traitement des cellules avec 100 μM de 4-HHE ou de 4-HNE en présence des micelles lipidiques entraîne une sécrétion de chylomicrons de taille différente. En effet suite à l'incubation avec le 4-HNE, la taille des chylomicrons diminue d'environ 20% comparé avec le contrôle (**Figure 8A**). En revanche, le traitement avec le 4-HHE augmente la taille des chylomicrons d'environ 25 % par rapport au contrôle non traité (**Figure 8B**). La quantité de TG détectés étant la même quel que soit l'alkénal incubé, le mécanisme par lequel les alkénals modifient la taille des chylomicrons reste encore à élucider. Toutefois, nos résultats suggèrent que l'impact des alkénals sur la taille des chylomicrons pourrait avoir des conséquences sur leur hydrolyse par la lipoprotéine lipase (LPL). En effet, cette enzyme impliquée dans l'hydrolyse des chylomicrons n'est pas libre dans le plasma mais fixée à l'endothélium vasculaire. Du fait de cette limitation d'accès à la LPL, à triglycéridémie égale, un faible nombre de gros chylomicrons sont plus facilement lipolysés par la LPL qu'un grand nombre de petits chylomicrons (Xiang, Cianflone et al. 1999).

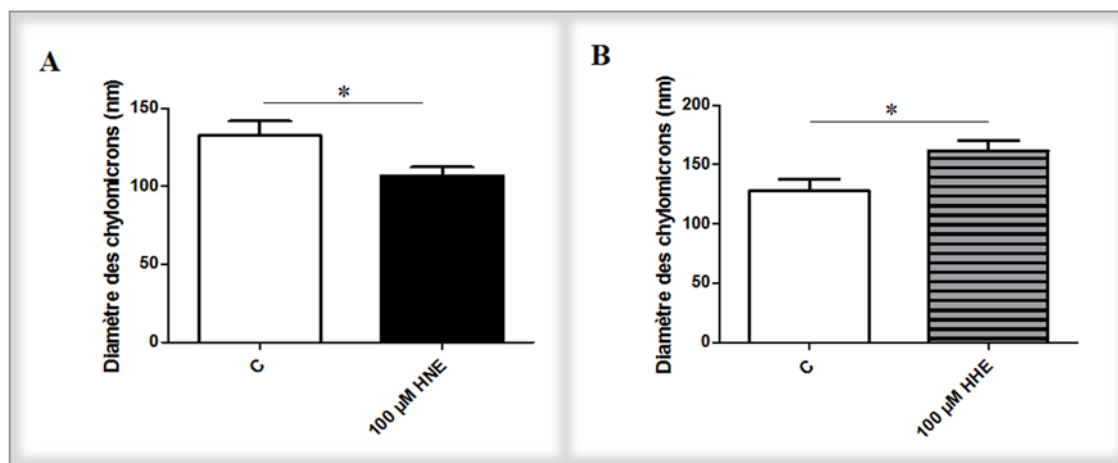


Figure 8 : Diamètre hydrodynamique des chylomicrons sécrétés par les Caco-2/TC7. Les cellules Caco-2/TC7 cultivées sur filtre sont incubées avec les micelles lipidiques (acide oléique : 0,5 mM) en présence de 100 μM de 4-HNE (A) ou de 100 μM de 4-HHE (B) pendant 24 heures. Les milieux basaux sont collectés et la taille des chylomicrons est ensuite mesurée par granulométrie comme expliqué dans la partie « matériels & méthodes ». Les résultats sont des moyenne \pm SEM et exprimés en nanomètres. $n=8$, $*P<0,05$.

Nos résultats mettent en évidence l'importance du rôle de l'intestin non seulement dans l'absorption de produits finaux d'oxydation des AGPI mais aussi dans leurs effets sur le métabolisme lipidique. Ainsi, toute dérégulation métabolique au niveau de cet organe pourrait être un élément clé dans le déclenchement et l'aggravation des désordres métaboliques.

En résumé, ces données *in vitro* mettent en évidence l'implication des 4-hydroxy-alkénals dans la génération du stress oxydant cellulaire et dans la perturbation de certaines fonctions cellulaires au niveau des cellules intestinales. En effet, ce stress cellulaire est associé au stress du RE et à l'induction de l'autophagie. En parallèle, nous avons montré que les 4-hydroxy-alkénals modifient le métabolisme lipidique en augmentant la lipogénèse par les cellules intestinales. Cette dérégulation est révélée par l'activation de l'enzyme ACC, par l'augmentation de l'expression de l'Apo B-48 et par la surproduction de TG dans le milieu basolatéral. Il est très intéressant de noter que ces différents aspects sont en lien étroit avec les mécanismes impliqués dans le développement des maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type II (stress oxydant, hyperlipémie). Ainsi, ces résultats pourraient permettre de trouver des cibles thérapeutiques pour limiter la progression des maladies métaboliques. Comme les régimes riches en AGPI *n-3*, et contenant probablement de faible quantité d'alkénals, sont décrits pour exercer des effets bénéfiques sur la lipémie plasmatique, il sera intéressant de poursuivre nos travaux en utilisant de plus faibles concentrations d'alkénals.

Conclusion & Perspectives

Conclusion & Perspectives

Ce travail avait pour objectif d'évaluer l'impact de la consommation d'AGPI *n*-3 à longue chaîne (DHA+EPA) sur le stress oxydant et l'inflammation dans un contexte de régime hyperlipidique, en se plaçant dans différentes situations d'apports alimentaires observées en pratique : (i) AGPI *n*-3 véhiculés soit sous forme de triglycérides (TG) soit sous forme de phospholipides (PL) et (ii) non oxydés ou modérément oxydés. Nous avons également étudié les conséquences de l'absorption de leurs produits d'oxydation au niveau intestinal, pour pouvoir apporter des éléments nécessaires dans le cadre de recommandations sur la formulation et la conservation des aliments riches ou supplémentés en AGPI *n*-3. En effet, une meilleure compréhension des impacts propres à la nature des structures véhiculant ces AGPI *n*-3 et à leur niveau d'oxydation dans les aliments semblait indispensable pour proposer des solutions aux questions relatives à la nutrition et à la prévention des pathologies liées à notre alimentation.

Dans la première partie de cette étude chez la souris, nous montrons que les AGPI *n*-3 réduisent l'inflammation systémique et le stress oxydant induits par un régime hyperlipidique quel que soit le type de molécule vectrice des AGPI *n*-3. Ceci est dû à l'enrichissement de différents tissus et du plasma en AGPI-LC *n*-3 après 8 semaines de régime. En ce qui concerne l'effet métabolique des molécules vectrices, nous montrons un rôle potentiel du vecteur PL (i) dans la diminution de la masse corporelle associée à une moindre taille des adipocytes et (ii) dans la stimulation du système antioxydant. Cette étude confirme qu'une alimentation enrichie en AGPI *n*-3 peut avoir des effets bénéfiques dans la prévention et/ou le traitement de troubles métaboliques et elle apporte des données nouvelles sur la contribution du vecteur des AGPI *n*-3 à la génération de ces effets, notamment par l'organisation du tissu adipeux.

Dans la deuxième partie de notre étude chez la souris, nous mettons en évidence que la consommation d'un régime riche en AGPI *n*-3 modérément oxydés augmente la concentration de 4-HHE, produit final d'oxydation des AGPI *n*-3, dans la circulation sanguine. Parallèlement, nous montrons pour la première fois que l'entérocyte est capable d'absorber le 4-HHE. Or, le 4-HHE est un produit très réactif et capable de réagir avec différentes cibles

telles que les protéines, les lipides et l'ADN, perturbant ainsi le fonctionnement cellulaire. De plus, nous montrons que l'oxydation des AGPI *n-3* génère une inflammation plasmatique et au niveau de l'intestin grêle. Cette inflammation semble également être associée à l'induction d'un stress cellulaire dans l'intestin grêle évalué par l'activation (i) des marqueurs du stress du RE tels que GRP78 et CHOP et (ii) de l'enzyme de défense antioxydante GPx2. Cependant, nous constatons que l'activation de ces voies n'est pas homogène tout au long de l'intestin grêle. En effet, le jéjunum représente la partie la plus atteinte et serait le segment le plus touché par ces réactions de défense.

Les résultats de notre étude sur les cellules intestinales Caco-2/TC7 ont permis de mieux comprendre ces données *in vivo*. Nous montrons en effet que les 4-hydroxy-alkénals sont capables de pénétrer la monocouche intestinale et de se retrouver dans le milieu basolatéral de manière dose-dépendante. De plus, nous montrons une forte induction de l'expression de l'enzyme antioxydante GPx2 et du marqueur du stress du RE, GRP78 dans les cellules. Ainsi, dans cette étude, nous montrons que les 4-hydroxy-alkénals induisent un stress cellulaire, notamment au travers de la formation d'adduits de Michael et de protéines carbonylées. A partir de ces données, nous nous sommes intéressés aux éventuelles modifications d'ultrastructures cellulaires après traitement des cellules avec les 4-hydroxy-alkénals. Nous observons une induction de l'autophagie suggérant que les cellules utilisent ce mécanisme de défense afin d'éliminer les organelles lésées et les protéines cytoplasmiques endommagées, sans induction d'inflammation. Ces données obtenues pourront être complétées en déterminant les effets des 4-hydroxy-alkénals sur l'induction de l'apoptose en étudiant plusieurs éléments potentiellement impliqués dans les cascades de signalisation de l'apoptose (caspase-3, protéine pro-apoptotique Bax, protéine anti-apoptotique Bcl-2).

Enfin, nous montrons également que les 4-hydroxy-alkénals, au moins à forte dose, modifient le métabolisme lipidique en augmentant la lipogenèse dans l'entérocyte. En effet, nos résultats révèlent une activation de l'enzyme ACC, une augmentation de l'expression de l'Apo B-48 et une surproduction de triglycérides associée à une modification de la taille des chylomicrons. L'ensemble des mécanismes sous jacents dans la régulation de la lipogenèse dans les entérocytes reste cependant à explorer.

Nos études apportent donc de nouvelles données aux domaines de la nutrition, de la formulation et du métabolisme des AGPI *n-3* et permettent de dévoiler les conséquences métaboliques de l'oxydation de ces lipides d'intérêt nutritionnel. L'ensemble de ces résultats

nous permet d'envisager de nombreuses perspectives de recherche. Il serait maintenant intéressant d'étudier sur les animaux les effets métaboliques d'un régime hyperlipidique supplémenté en AGPI *n-3* à différentes doses et oxydés à plusieurs niveaux. De plus, il serait intéressant de travailler à teneurs en lipides croissantes (35, 45, 60 % d'AET) afin de mettre en évidence une éventuelle contribution de la consommation excessive des lipides dans la progression et l'aggravation des effets de l'oxydation de ces AGPI. Cela pourrait contribuer à guider l'évolution de recommandations nutritionnelles pour optimiser les effets métaboliques bénéfiques des lipides et assurer la sécurité des aliments enrichis en AGPI *n-3*.

Afin de mieux comprendre le rôle des AGPI *n-3* et de leurs produits d'oxydation sur les dérégulations du métabolisme lipidique, une étude semblable pourrait être menée avec un modèle de souris invalidées pour l'apolipoprotéine-E, qui développent spontanément une hyperlipémie liée aux VLDL et de l'athérosclérose. L'étude de ce modèle animal permettrait d'évaluer, dans un contexte pathologique, si l'oxydation des AGPI *n-3* contrecarre leurs effets bénéfiques réputés sur le développement de la plaque d'athérome.

Actuellement, plusieurs travaux s'intéressent à l'oxydation des aliments riches en AGPI au cours de la digestion, notamment dans le tractus gastro-intestinal qui semble pouvoir constituer un environnement favorable à l'oxydation des lipides. Le but de ces travaux est de déterminer si un aliment enrichi en AGPI *n-3* et initialement non oxydé, pourrait s'oxyder dans le tractus et exercer ainsi des effets métaboliques spécifiques. De plus, l'identification des acteurs responsables de cette oxydation serait intéressante afin d'avoir les outils pour réguler l'apparition de composés oxydés, notamment grâce à des antioxydants alimentaires.

Enfin, le 4-HHE n'est certainement pas responsable à lui seul des effets métaboliques observés de l'oxydation modérée des AGPI *n-3*. En effet, l'oxydation de ces acides gras dans le cadre d'un régime hyperlipidique peut contribuer à la formation de nombreuses molécules comme par exemple des monoacylglycérols contenant des hydroperoxydes. Ces molécules réactives peuvent aussi exercer des effets métaboliques associés au stress oxydant. Il apparaît donc désormais nécessaire de poursuivre des travaux visant à approfondir notre connaissance des mécanismes par lesquels l'oxydation des AGPI *n-3* altère leurs effets métaboliques.

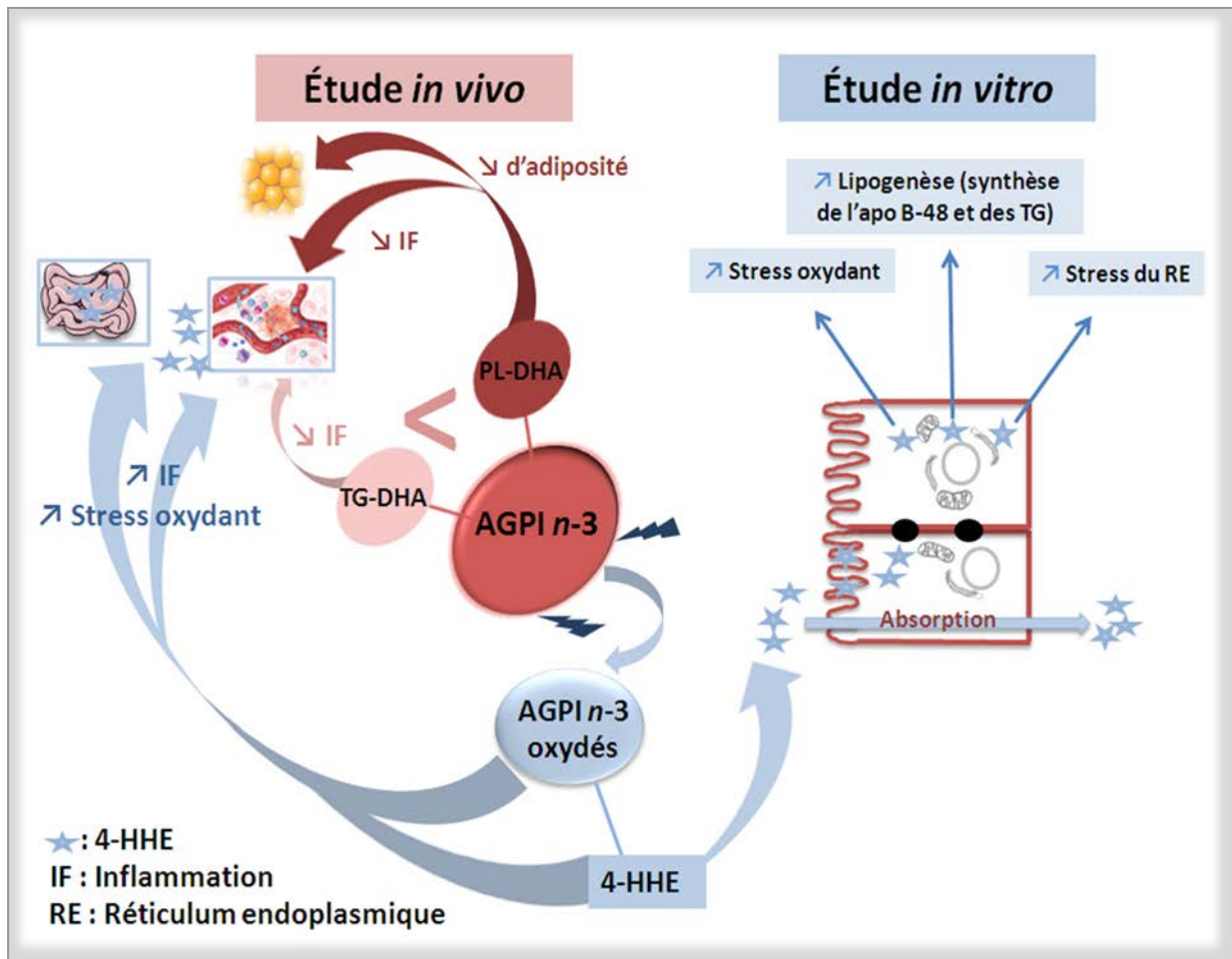


Schéma décrivant la synthèse de l'étude

Références bibliographiques

- Adam, O., C. Beringer, et al. (2003). "Anti-inflammatory effects of a low arachidonic acid diet and fish oil in patients with rheumatoid arthritis." Rheumatol Int **23**(1): 27-36.
- Adeli, K. and G. F. Lewis (2008). "Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states." Curr Opin Lipidol **19**(3): 221-8.
- AFSSA (2009). "Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA2)."
- AFSSA (2010). Avis de l'agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. [<http://www.anses.fr/Documents/NUT2006sa0359.pdf>].
- Agellon, L. B., M. J. Toth, et al. (2002). "Intracellular lipid binding proteins of the small intestine." Mol Cell Biochem **239**(1-2): 79-82.
- Alghazeer, R., H. Gao, et al. (2008). "Cytotoxicity of oxidised lipids in cultured colonal human intestinal cancer cells (caco-2 cells)." Toxicol Lett **180**(3): 202-11.
- Allard, J. P., R. Kurian, et al. (1997). "Lipid peroxidation during n-3 fatty acid and vitamin E supplementation in humans." Lipids **32**(5): 535-41.
- Armand, M., P. Borel, et al. (1994). "Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach." Am J Physiol **266**(3 Pt 1): G372-81.
- Arthur, J. R. (2000). "The glutathione peroxidases." Cell Mol Life Sci **57**(13-14): 1825-35.
- Awasthi, Y. C., G. A. Ansari, et al. (2005). "Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases." Methods Enzymol **401**: 379-407.
- Awasthi, Y. C., R. Sharma, et al. (2003). "Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling." Mol Aspects Med **24**(4-5): 219-30.
- Ayabe, T., D. P. Satchell, et al. (2000). "Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria." Nat Immunol **1**(2): 113-8.
- Bacot, S., N. Bernoud-Hubac, et al. (2007). "Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxy-alkenals." J Lipid Res **48**(4): 816-25.
- Bae, E. H., S. Cho, et al. (2011). "4-Hydroxy-2-hexenal-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells." Nephrol Dial Transplant **26**(12): 3866-73.
- Balaban, R. S., S. Nemoto, et al. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." Cell **120**(4): 483-95.

- Barrera, G., S. Pizzimenti, et al. (1996). "Effect of 4-Hydroxynonenal on cell cycle progression and expression of differentiation-associated antigens in HL-60 cells." Free Radic Biol Med **20**(3): 455-62.
- Bays, H. (2008). "Rationale for prescription omega-3-acid ethyl ester therapy for hypertriglyceridemia: a primer for clinicians." Drugs Today (Barc) **44**(3): 205-46.
- Bestwick, C. S. and L. Milne (2001). "Quercetin modifies reactive oxygen levels but exerts only partial protection against oxidative stress within HL-60 cells." Biochim Biophys Acta **1528**(1): 49-59.
- Biasi, F., B. Vizio, et al. (2006). "c-Jun N-terminal kinase upregulation as a key event in the proapoptotic interaction between transforming growth factor-beta1 and 4-hydroxynonenal in colon mucosa." Free Radic Biol Med **41**(3): 443-54.
- Blais, A., P. Bissonnette, et al. (1987). "Common characteristics for Na⁺-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon." J Membr Biol **99**(2): 113-25.
- Boden, G., X. Duan, et al. (2008). "Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals." Diabetes **57**(9): 2438-44.
- Bradley, M. A., S. Xiong-Fister, et al. (2012). "Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression." Neurobiol Aging **33**(6): 1034-44.
- Brawn, K. and I. Fridovich (1980). "Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense." Acta Physiol Scand Suppl **492**: 9-18.
- Brown, J. E. and K. W. Wahle (1990). "Effect of fish-oil and vitamin E supplementation on lipid peroxidation and whole-blood aggregation in man." Clin Chim Acta **193**(3): 147-56.
- Bunea, R., K. El Farrah, et al. (2004). "Evaluation of the effects of Neptune krill oil on the clinical course of hyperlipidemia." Alternat Med Rev **9**(4): 420-428.
- Burdge, G. (2004). "Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **7**(2): 137-44.
- Burdge, G. C. and P. C. Calder (2005). "Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults." Reprod Nutr Dev **45**(5): 581-97.
- Camandola, S., G. Poli, et al. (2000). "The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal inhibits constitutive and inducible activity of nuclear factor kappa B in neurons." Brain Res Mol Brain Res **85**(1-2): 53-60.

- Cansell, M., N. Moussaoui, et al. (2006). "Feeding rats with liposomes or fish oil differently affects their lipid metabolism." Eur J Lipid Sci and Tech **108**(6): 459-467.
- Cansell, M., F. Nacka, et al. (2003). "Marine lipid-based liposomes increase in vivo FA biavailability." Lipids **38**(5): 551-559.
- Capeau, J. (2003). "[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]." Med Sci (Paris) **19**(8-9): 834-9.
- Carriere, F., J. A. Barrowman, et al. (1993). "Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans." Gastroenterology **105**(3): 876-88.
- Chantret, I., A. Rodolosse, et al. (1994). "Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation." J Cell Sci **107** (Pt 1): 213-25.
- Chateau, D., T. Pauquai, et al. (2005). "Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells." J Cell Physiol **202**(3): 767-76.
- Chaves, C. R., P. R. Elias, et al. (2003). "Long chain fatty acid uptake by human intestinal mucosa in vitro: mechanisms of transport." Digestion **67**(1-2): 32-6.
- Chen, F. (2005). "Is NF-kappaB a culprit in type 2 diabetes?" Biochem Biophys Res Commun **332**(1): 1-3.
- Cheng, J. Z., S. S. Singhal, et al. (1999). "Effects of mGST A4 transfection on 4-hydroxynonenal-mediated apoptosis and differentiation of K562 human erythroleukemia cells." Arch Biochem Biophys **372**(1): 29-36.
- Chiang, Y. F., H. M. Shaw, et al. (2011). "Dietary oxidised frying oil causes oxidative damage of pancreatic islets and impairment of insulin secretion, effects associated with vitamin E deficiency." Br J Nutr **105**(9): 1311-9.
- Cinti, S., G. Mitchell, et al. (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." J Lipid Res **46**(11): 2347-55.
- CNAM (1999). "Rapport sur la prise en charge des diabétiques exclusivement traités par hypoglycémiant oraux en 1998." Programme de santé publique : Diabète de type 2.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, et al. (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." Faseb J **17**(10): 1195-214.

- Cosgrove, J. P., D. F. Church, et al. (1987). "The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids." Lipids **22**(5): 299-304.
- Cox, J. S., R. E. Chapman, et al. (1997). "The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane." Mol Biol Cell **8**(9): 1805-14.
- Croset, M., E. Vericel, et al. (1990). "Functions and tocopherol content of blood platelets from elderly people after low intake of purified eicosapentaenoic acid." Thromb Res **57**(1): 1-12.
- Cunliffe, R. N., F. R. Rose, et al. (2001). "Human defensin 5 is stored in precursor form in normal Paneth cells and is expressed by some villous epithelial cells and by metaplastic Paneth cells in the colon in inflammatory bowel disease." Gut **48**(2): 176-85.
- Davies, M. J. (2004). "Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen." Photochem Photobiol Sci **3**(1): 17-25.
- Decker, T. and M. L. Lohmann-Matthes (1988). "A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity." J Immunol Methods **115**(1): 61-9
- de Luca, C. and J. M. Olefsky (2008). "Inflammation and insulin resistance." FEBS Lett **582**(1): 97-105.
- Delie, F. and W. Rubas (1997). "A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **14**(3): 221-86.
- Demozay, D., J. C. Mas, et al. (2008). "FALDH reverses the deleterious action of oxidative stress induced by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes." Diabetes **57**(5): 1216-26.
- Deniaud, A., O. Sharaf el dein, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis." Oncogene **27**(3): 285-99.
- Din, J. N., S. A. Harding, et al. (2008). "Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man." Atherosclerosis **197**(1): 290-6.
- Drover, V. A., M. Ajmal, et al. (2005). "CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood." J Clin Invest **115**(5): 1290-7.

- Ebato, C., T. Uchida, et al. (2008). "Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet." Cell Metab **8**(4): 325-32.
- Eisenberg-Lerner, A., S. Bialik, et al. (2009). "Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them." Cell Death Differ **16**(7): 966-75.
- Erlandsen, S. L. and D. G. Chase (1974). "Morphological alterations in the microvillous border of villous epithelial cells produced by intestinal microorganisms." Am J Clin Nutr **27**(11): 1277-86.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur, et al. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**(1): 81-128.
- Esterbauer, H. and H. Zollner (1989). "Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products." Free Radic Biol Med **7**(2): 197-203.
- Federico, L. M., M. Naples, et al. (2006). "Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein B48 lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1B, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine." Diabetes **55**(5): 1316-26.
- Frankel E.N., 2005. Lipid oxidation. 2nd Edition., The Oily Press, P.J. Barnes, Bridgwater; xvi + 470 pp. UK ISBN: 0-9531949-8-1
- Fritsche, K. L. and P. V. Johnston (1988). "Rapid autoxidation of fish oil in diets without added antioxidants." J Nutr **118**(4): 425-6.
- Geleijnse, J. M., E. J. Giltay, et al. (2002). "Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials." J Hypertens **20**(8): 1493-9.
- Genot, C. and M. Michalski (2010). "Impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments." Innovations Agronomiques **10**: 43-67.
- Gladine, C., N. C. Roy, et al. (2012). "Increasing intake of long-chain n-3 PUFA enhances lipoperoxidation and modulates hepatic gene expression in a dose-dependent manner." Br J Nutr **107**(9): 1254-1273.
- Goicoechea, E., E. F. Brandon, et al. (2011). "Fate in digestion in vitro of several food components, including some toxic compounds coming from omega-3 and omega-6 lipids." Food Chem Toxicol **49**(1): 115-24.

- Gonzalez, M. J., J. I. Gray, et al. (1992). "Lipid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidants." J Nutr **122**(11): 2190-5.
- Greenwalt, D. E., S. H. Scheck, et al. (1995). "Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet." J Clin Invest **96**(3): 1382-8.
- Grune, T., K. Kramer, et al. (2001). "Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids: effects of vitamin E supplementation." Lipids **36**(8): 833-8.
- Guichardant, M., S. Bacot, et al. (2006). "Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **75**(3): 179-82.
- Guichardant, M., P. Taibi-Tronche, et al. (1998). "Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal." Free Radic Biol Med **25**(9): 1049-56.
- Guilherme, A., J. V. Virbasius, et al. (2008). "Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 367-77.
- Guillot, N., E. Caillet, et al. (2009). "Increasing intakes of the long-chain omega-3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men." Faseb J **23**(9): 2909-16.
- Halvorsen, B. L. and R. Blomhoff (2011). "Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements." Food Nutr Res **55**.
- Hamilton, J. A. and F. Kamp (1999). "How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?" Diabetes **48**(12): 2255-69.
- Harris, W. S. (1997). "n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies." Am J Clin Nutr **65**(5 Suppl): 1645S-1654S.
- Hattori, Y., S. Hattori, et al. (2001). "4-hydroxynonenal prevents NO production in vascular smooth muscle cells by inhibiting nuclear factor-kappaB-dependent transcriptional activation of inducible NO synthase." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1179-83.
- Heistad, D. D., Y. Wakisaka, et al. (2009). "Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases." Circ J **73**(2): 201-7.
- Hildebrand, P., C. Beglinger, et al. (1990). "Effects of a cholecystokinin receptor antagonist on intestinal phase of pancreatic and biliary responses in man." J Clin Invest **85**(3): 640-6.

- Hill, B. G., P. Haberzettl, et al. (2008). "Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells." Biochem J **410**(3): 525-34.
- Horakova, D., D. Pastucha, et al. (2011). "Adipocyte fatty acid binding protein and C-reactive protein levels as indicators of insulin resistance development." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(4): 355-9.
- Horton, A. A. and S. Fairhurst (1987). "Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity." Crit Rev Toxicol **18**(1): 27-79.
- Hotamisligil, G. S. (2007). "Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and type 2 diabetes." Novartis Found Symp **286**: 86-94; discussion 94-8, 162-3, 196-203.
- Hotamisligil, G. S., P. Arner, et al. (1995). "Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance." J Clin Invest **95**(5): 2409-15.
- Hotamisligil, G. S. and B. M. Spiegelman (1994). "Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link." Diabetes **43**(11): 1271-8.
- Huang, J., G. Y. Lam, et al. (2011). "Autophagy signaling through reactive oxygen species." Antioxid Redox Signal **14**(11): 2215-31.
- Hummasti, S. and G. S. Hotamisligil (2010). "Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes." Circ Res **107**(5): 579-91.
- Hussain, M. M., R. K. Kancha, et al. (1996). "Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors." Biochim Biophys Acta **1300**(3): 151-70.
- Inui, K., M. Yamamoto, et al. (1992). "Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: specific transport systems in apical and basolateral membranes." J Pharmacol Exp Ther **261**(1): 195-201.
- Ji, C., K. R. Kozak, et al. (2001). "IkappaB kinase, a molecular target for inhibition by 4-hydroxy-2-nonenal." J Biol Chem **276**(21): 18223-8.
- Je, J. H., J. Y. Lee, et al. (2004). "NF-kappaB activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway." FEBS Lett **566**(1-3): 183-9.
- Ji, L. L., R. Fu, et al. (1992). "Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity." J Appl Physiol **73**(5): 1854-9.

- Jiang, H. Y., S. A. Wek, et al. (2003). "Phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses." Mol Cell Biol **23**(16): 5651-63.
- Jumarie, C. and C. Malo (1991). "Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro." J Cell Physiol **149**(1): 24-33.
- Kammoun, H. L., I. Hainault, et al. (2009). "Nutritional related liver disease: targeting the endoplasmic reticulum stress." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **12**(6): 575-82.
- Kanazawa, K. and H. Ashida (1998a). "Catabolic fate of dietary trilinoleoylglycerol hydroperoxides in rat gastrointestinal tract." Biochim Biophys Acta **1393**(2-3): 336-48.
- Kanazawa, K. and H. Ashida (1998b). "Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body." Biochim Biophys Acta **1393**(2-3): 349-61.
- Kang, S. C., H. W. Kim, et al. (2011). "Hepatotoxicity and nephrotoxicity produced by 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) following 4-week oral administration to Sprague-Dawley rats." J Toxicol Environ Health A **74**(12): 779-89.
- Kasai, H. and K. Kawai (2008). "4-oxo-2-hexenal, a mutagen formed by omega-3 fat peroxidation: occurrence, detection and adduct formation." Mutat Res **659**(1-2): 56-9.
- Kaser, A., M. B. Flak, et al. (2011). "The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation." Exp Cell Res **317**(19): 2772-9.
- Kidd, P. M. (2007). "Omega-3 EPA and DHA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids." Alternative Medicine Review **12**(3): 207-227.
- Kim, Y. S., Z. Y. Park, et al. (2009). "Alteration of Toll-like receptor 4 activation by 4-hydroxy-2-nonenal mediated by the suppression of receptor homodimerization." Chem Biol Interact **182**(1): 59-66.
- Kirkman, H. N., M. Rolfo, et al. (1999). "Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry." J Biol Chem **274**(20): 13908-14.
- Kitamura, M. (2011). "Control of NF-kappaB and inflammation by the unfolded protein response." Int Rev Immunol **30**(1): 4-15.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." Science **290**(5497): 1717-21.

- Kraehenbuhl, J. P., E. Pringault, et al. (1997). "Review article: Intestinal epithelia and barrier functions." Aliment Pharmacol Ther **11 Suppl 3**: 3-8; discussion 8-9.
- Kremmyda, L. S., E. Tvrzicka, et al. (2011). "Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(3): 195-218.
- Kristal, B. S., B. K. Park, et al. (1996). "4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition." J Biol Chem **271**(11): 6033-8.
- Kroemer, G. and M. Jaattela (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." Nat Rev Cancer **5**(11): 886-97.
- Kroemer, G., G. Marino, et al. (2010). "Autophagy and the integrated stress response." Mol Cell **40**(2): 280-93.
- Kutuk, O. and H. Basaga (2007). "Apoptosis signalling by 4-hydroxynonenal: a role for JNK-c-Jun/AP-1 pathway." Redox Rep **12**(1): 30-4.
- Lee, C. S. and K. H. Kaestner (2004). "Clinical endocrinology and metabolism. Development of gut endocrine cells." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **18**(4): 453-62.
- Lee, J. Y., J. H. Je, et al. (2004). "Induction of endothelial apoptosis by 4-hydroxyhexenal." Eur J Biochem **271**(7): 1339-47.
- Lennernas, H. (1997). "Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models." J Pharm Pharmacol **49**(7): 627-38.
- Leonarduzzi, G., F. Robbesyn, et al. (2004). "Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal." Free Radic Biol Med **37**(11): 1694-702.
- Li, J. H., J. P. Yu, et al. (2005). "Expression and significance of nuclear factor kappaB p65 in colon tissues of rats with TNBS-induced colitis." World J Gastroenterol **11**(12): 1759-63.
- Li, Y., G. Wei, et al. (2004). "Glutathione: a review on biotechnological production." Appl Microbiol Biotechnol **66**(3): 233-42.
- Loirdighi, N., D. Menard, et al. (1992). "Insulin decreases chylomicron production in human fetal small intestine." Biochim Biophys Acta **1175**(1): 100-6.
- Long, E. K. and M. J. Picklo, Sr. (2010). "Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: make some room HNE." Free Radic Biol Med **49**(1): 1-8.

- Lovejoy, J. C. (2002). "The influence of dietary fat on insulin resistance." Curr Diab Rep **2**(5): 435-40.
- Luckey, S. W., M. Taylor, et al. (2002). "4-hydroxynonenal decreases interleukin-6 expression and protein production in primary rat Kupffer cells by inhibiting nuclear factor-kappaB activation." J Pharmacol Exp Ther **302**(1): 296-303.
- Maiese, K., Z. Z. Chong, et al. (2007). "Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress." Curr Med Chem **14**(16): 1729-38.
- Marquez-Quinones, A., A. Cipak, et al. (2010). "HNE-protein adducts formation in different pre-carcinogenic stages of hepatitis in LEC rats." Free Radic Res **44**(2): 119-27.
- Mateos, R., E. Lecumberri, et al. (2005). "Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **827**(1): 76-82.
- McGrath, L. T., B. M. McGleenon, et al. (2001). "Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde." Qjm **94**(9): 485-90.
- McGuckin, M. A., R. D. Eri, et al. (2010). "ER stress and the unfolded protein response in intestinal inflammation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **298**(6): G820-32.
- Melo, A., L. Monteiro, et al. (2011). "Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives." Oxid Med Cell Longev **2011**: 467180.
- Meydani, M., F. Natiello, et al. (1991). "Effect of long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women." J Nutr **121**(4): 484-91.
- Michalski, M. C., C. Calzada, et al. (2008). "Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk--a preliminary study." Mol Nutr Food Res **52**(12): 1478-85.
- Miller, D. M., G. R. Buettner, et al. (1990). "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions." Free Radic Biol Med **8**(1): 95-108.
- Minekura, H., T. Kumagai, et al. (2001). "4-Hydroxy-2-nonenal is a powerful endogenous inhibitor of endothelial response." Biochem Biophys Res Commun **282**(2): 557-61.
- Moore, S. A., E. Yoder, et al. (1990). "Role of the blood-brain barrier in the formation of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids from essential fatty acid precursors." J Neurochem **55**(2): 391-402.

- Moreau, H., R. Laugier, et al. (1988). "Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin." Gastroenterology **95**(5): 1221-6.
- Mori, T. A. (2004). "Effect of fish and fish oil-derived omega-3 fatty acids on lipid oxidation." Redox Rep **9**(4): 193-7.
- Mori, T. A., I. B. Puddey, et al. (2000). "Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GC-MS measurement of urinary F2-isoprostane excretion." Redox Rep **5**(1): 45-6.
- Mori, T. A., R. J. Woodman, et al. (2003). "Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects." Free Radic Biol Med **35**(7): 772-81.
- Morrison, W. R. and L. M. Smith (1964). "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol." J Lipid Res **5**: 600-8.
- Moynagh, P. N. (2005). "The NF-kappaB pathway." J Cell Sci **118**(Pt 20): 4589-92.
- Munasinghe, D. M., K. Ichimaru, et al. (2003). "Lipid peroxidation-derived cytotoxic aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal in smoked pork." Meat Sci **63**(3): 377-80.
- Nevalainen, T. J., J. M. Gronroos, et al. (1995). "Expression of group II phospholipase A2 in the human gastrointestinal tract." Lab Invest **72**(2): 201-8.
- Niki, E. (2009). "Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects." Free Radic Biol Med **47**(5): 469-84.
- Ortega, A., L. M. Varela, et al. (2012). "Dietary fatty acids linking postprandial metabolic response and chronic diseases." Food Funct **3**(1): 22-7.
- Ouchi, N., J. L. Parker, et al. (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." Nat Rev Immunol **11**(2): 85-97.
- Ouellette, A. J. and C. L. Bevins (2001). "Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel." Inflamm Bowel Dis **7**(1): 43-50.
- Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." Science **306**(5695): 457-61.
- Page, S., C. Fischer, et al. (1999). "4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis." J Biol Chem **274**(17): 11611-8.

- Park, Y., S. Nam, et al. (2009). "Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids increase oxidative stress in rats with intracerebral hemorrhagic stroke." Nutr Res **29**(11): 812-8.
- Petersen, D. R. and J. A. Doorn (2004). "Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets." Free Radic Biol Med **37**(7): 937-45.
- Petit, V., I. Niot, et al. (2007). "Absorption intestinale des acides gras: faits et incertitudes." Nutrition Clinique et Métabolisme **21**: 38-45.
- Phillips, C., A. Bennett, et al. (2002). "Intestinal rather than hepatic microsomal triglyceride transfer protein as a cause of postprandial dyslipidemia in diabetes." Metabolism **51**(7): 847-52.
- Pierre, F., S. Tache, et al. (2007). "Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats." Carcinogenesis **28**(2): 321-7.
- Pillon, N. J., R. E. Vella, et al. (2011). "Structural and functional changes in human insulin induced by the lipid peroxidation byproducts 4-hydroxy-2-nonenal and 4-hydroxy-2-hexenal." Chem Res Toxicol **24**(5): 752-62.
- Pillon, N. (2010). [Role of 4-hydroxy-alkenals, derived from lipid peroxidation, in the pathophysiology of insulin resistance]. EDISS-Biochimie. Villeurbanne, INSA-Lyon. **PhD**: 167.
- Pinto, D. and H. Clevers (2005). "Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium." Exp Cell Res **306**(2): 357-63.
- Pizzimenti, S., E. Menegatti, et al. (2009). "4-Hydroxynonenal, a lipid peroxidation product of dietary polyunsaturated fatty acids, has anticarcinogenic properties in colon carcinoma cell lines through the inhibition of telomerase activity." J Nutr Biochem.
- Pizzimenti, S., E. Menegatti, et al. (2010). "4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product of dietary polyunsaturated fatty acids, has anticarcinogenic properties in colon carcinoma cell lines through the inhibition of telomerase activity." J Nutr Biochem **21**(9): 818-26.
- Poirier, H., I. Niot, et al. (1997). "Fatty acid regulation of fatty acid-binding protein expression in the small intestine." Am J Physiol **273**(2 Pt 1): G289-95.
- Poli, G., M. U. Dianzani, et al. (1985). "Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions." Biochem J **227**(2): 629-38.

- Porter, N. A., S. E. Caldwell, et al. (1995). "Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids." Lipids **30**(4): 277-90.
- Quinlan, G. J., N. J. Lamb, et al. (1996). "Plasma fatty acid changes and increased lipid peroxidation in patients with adult respiratory distress syndrome." Crit Care Med **24**(2): 241-6.
- Rath, E. and D. Haller (2011). "Inflammation and cellular stress: a mechanistic link between immune-mediated and metabolically driven pathologies." Eur J Nutr **50**(4): 219-33.
- Raza, H. and A. John (2006). "4-hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells." Toxicol Appl Pharmacol **216**(2): 309-18.
- Ricordeau, P., A. Weill, et al. (2000). "The cost of diabetes in metropolitan France." Diabetes and Metabolism **26**(6): 14.
- Romano, A. D., G. Serviddio, et al. (2010). "Oxidative stress and aging." J Nephrol **23 Suppl 15**: S29-36.
- Roytblat, L., M. Rachinsky, et al. (2000). "Raised interleukin-6 levels in obese patients." Obes Res **8**(9): 673-5.
- Ruef, J., M. Moser, et al. (2001). "4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells." Basic Res Cardiol **96**(2): 143-50.
- Ruef, J., G. N. Rao, et al. (1998). "Induction of rat aortic smooth muscle cell growth by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal." Circulation **97**(11): 1071-8.
- Russell, A. P., G. Gastaldi, et al. (2003). "Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids?" FEBS Lett **551**(1-3): 104-6.
- Sakai, T., S. Kuwazuru, et al. (1995). "A lipid peroxidation-derived aldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal and omega 6 fatty acids contents in meats." Biosci Biotechnol Biochem **59**(7): 1379-80.
- Salvini, S., M. Charbonnier, et al. (2002). "Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing." Br J Nutr **87**(3): 211-7.
- Sambuy, Y., I. De Angelis, et al. (2005). "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics." Cell Biol Toxicol **21**(1): 1-26.

- Sarkar, F. H., Y. Li, et al. (2008). "NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases." Int Rev Immunol **27**(5): 293-319.
- Schaffer, J. E. and H. F. Lodish (1994). "Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein." Cell **79**(3): 427-36.
- Schauenstein, E. (1967). "Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products." J Lipid Res **8**(5): 417-28.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." Cell **47**(6): 921-8.
- Shibata, N., S. Yamada, et al. (2004). "Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis." Brain Res **1019**(1-2): 170-7.
- Shoelson, S. E., L. Herrero, et al. (2007). "Obesity, inflammation, and insulin resistance." Gastroenterology **132**(6): 2169-80.
- Sies, H. (1991). "Role of reactive oxygen species in biological processes." Klin Wochenschr **69**(21-23): 965-8.
- Singh, S. P., M. Niemczyk, et al. (2009). "Fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* triggered by the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal (4-HNE)." Aging (Albany NY) **1**(1): 68-80.
- Sirtori, C. R. and C. Galli (2002). "N-3 fatty acids and diabetes." Biomed Pharmacother **56**(8): 397-406.
- Soulere, L., Y. Queneau, et al. (2007). "An expeditious synthesis of 4-hydroxy-2E-nonenal (4-HNE), its dimethyl acetal and of related compounds." Chem Phys Lipids **150**(2): 239-43.
- Stahl, A., D. J. Hirsch, et al. (1999). "Identification of the major intestinal fatty acid transport protein." Mol Cell **4**(3): 299-308.
- Stillwell, W. (2008). "Docosahexaenoic acid: a most unusual fatty acid." Chem Phys Lipids **153**(1): 1-2.
- Storlien, L. H., A. J. Hulbert, et al. (1998). "Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **1**(6): 559-63.
- Stremmel, W. (1988). "Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein." J Clin Invest **82**(6): 2001-10.

- Stremmel, W., G. Lotz, et al. (1985). "Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes." J Clin Invest **75**(3): 1068-76.
- Stremmel, W., G. Strohmeyer, et al. (1985). "Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(1): 4-8.
- Sun, X. F. and H. Zhang (2007). "NFkB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases." Histol Histopathol **22**(12): 1387-98.
- Suresh, Y. and U. N. Das (2003). "Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: effect of omega-6 fatty acids." Nutrition **19**(2): 93-114.
- Surh, J., S. Lee, et al. (2007). "4-hydroxy-2-alkenals in polyunsaturated fatty acids-fortified infant formulas and other commercial food products." Food Addit Contam **24**(11): 1209-18.
- Tang, X., Z. J. Li, et al. (2012). "Short term effects of different omega-3 fatty acid formulation on lipid metabolism in mice fed high or low fat diet." Lipids Health Dis **11**: 70.
- Thwaites, D. T., G. T. McEwan, et al. (1993). "H(+)-coupled (Na(+)-independent) proline transport in human intestinal (Caco-2) epithelial cell monolayers." FEBS Lett **333**(1-2): 78-82.
- Tilstra, J. S., C. L. Clauson, et al. (2011). "NF-kappaB in Aging and Disease." Aging Dis **2**(6): 449-65.
- Todoric, J., M. Loffler, et al. (2006). "Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids." Diabetologia **49**(9): 2109-19.
- Tou, J. C., J. Jaczynski, et al. (2007). "Krill for human consumption: nutritional value and potential health benefits." Nutr Rev **65**(2): 63-77.
- Traenckner, E. B., H. L. Pahl, et al. (1995). "Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli." EMBO J **14**(12): 2876-83.
- Trotter, P. J., S. Y. Ho, et al. (1996). "Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells." J Lipid Res **37**(2): 336-46.

- Tsuduki, T., T. Honma, et al. (2011). "Long-term intake of fish oil increases oxidative stress and decreases lifespan in senescence-accelerated mice." Nutrition **27**(3): 334-7.
- Uchida, K. (2003). "4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress." Prog Lipid Res **42**(4): 318-43.
- Uchida, K. (2003). "Histidine and lysine as targets of oxidative modification." Amino Acids **25**(3-4): 249-57.
- Uchida, K., M. Shiraishi, et al. (1999). "Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production." J Biol Chem **274**(4): 2234-42.
- Uehara, T., T. Nakamura, et al. (2006). "S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration." Nature **441**(7092): 513-7.
- Ulven, S. M., B. Kirkhus, et al. (2011). "Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers." Lipids **46**(1): 37-46.
- Ursini, F., A. Zamburlini, et al. (1998). "Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis." Free Radic Biol Med **25**(2): 250-2.
- van Kuijk, F. J., D. W. Thomas, et al. (1986). "Occurrence of 4-hydroxyalkenals in rat tissues determined as pentafluorobenzyl oxime derivatives by gas chromatography-mass spectrometry." Biochem Biophys Res Commun **139**(1): 144-9.
- Vericel, E., C. Calzada, et al. (1999). "The influence of low intake of n-3 fatty acids on platelets in elderly people." Atherosclerosis **147**(1): 187-92.
- Viatour, P., M. P. Merville, et al. (2005). "Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation." Trends Biochem Sci **30**(1): 43-52.
- Vidal-Vanaclocha, F. (2009). "Inflammation in the molecular pathogenesis of cancer and atherosclerosis." Reumatol Clin **5S1**: 40-3.
- Vincent, H. K., K. E. Innes, et al. (2007). "Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity." Diabetes Obes Metab **9**(6): 813-39.
- Visser, M., L. M. Bouter, et al. (1999). "Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults." JAMA **282**(22): 2131-5.

- Vladykovskaya, E., S. D. Sithu, et al. (2012). "The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes endothelial activation by inducing endoplasmic reticulum stress." J Biol Chem doi/10.1074/jbc.M111.320416.
- Wang, C., W. S. Harris, et al. (2006). "n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review." Am J Clin Nutr **84**(1): 5-17.
- Wang, T. G., Y. Gotoh, et al. (2000). "Lipid hydroperoxide-induced apoptosis in human colonic CaCo-2 cells is associated with an early loss of cellular redox balance." Faseb J **14**(11): 1567-76.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-808.
- Westergaard, H. and J. M. Dietschy (1976). "The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell." J Clin Invest **58**(1): 97-108.
- Whelan, J. and C. Rust (2006). "Innovative dietary sources of n-3 fatty acids." Annu Rev Nutr **26**: 75-103.
- Wiernsperger, N. F. (2003). "Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy." Diabetes Metab **29**(6): 579-85.
- Wilson, R., K. Lyall, et al. (2002). "Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of 'oxidative stress' in vivo." Free Radic Biol Med **32**(2): 162-8.
- Wingler, K., C. Muller, et al. (2000). "Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells." Gastroenterology **119**(2): 420-30.
- Winkler, B. S., S. M. Orselli, et al. (1994). "The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective." Free Radic Biol Med **17**(4): 333-49.
- Wu, M., S. Yang, et al. (2012). "Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stresses Mediate Apoptosis Induced by Modified LDL in Human Retinal Muller Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci. **53**:4595-4604.
- Xiang, S. Q., K. Cianflone, et al. (1999). "Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase." J Lipid Res **40**(9): 1655-63.

- Xiao, C. and G. F. Lewis (2012). "Regulation of chylomicron production in humans." Biochim Biophys Acta **1821**(5): 736-46.
- Xie, Y., F. Nassir, et al. (2003). "Intestinal lipoprotein assembly in apobec-1^{-/-} mice reveals subtle alterations in triglyceride secretion coupled with a shift to larger lipoproteins." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **285**(4): G735-46.
- Xie, Y., E. P. Newberry, et al. (2006). "Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency." J Biol Chem **281**(7): 4075-86.
- Yang, L., P. Li, et al. (2010). "Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance." Cell Metab **11**(6): 467-78.
- Zarrouki, B., A. F. Soares, et al. (2007). "The lipid peroxidation end-product 4-HNE induces COX-2 expression through p38MAPK activation in 3T3-L1 adipose cell." FEBS Lett **581**(13): 2394-400.
- Zhang, K. and R. J. Kaufman (2008). "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response." Nature **454**(7203): 455-62.
- Zhou, J., S. Lhotak, et al. (2005). "Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **111**(14): 1814-21.

Annexes



Annexe 1 Les amorces des gènes utilisées pour la RT-PCR

Gène	Symbole officiel	Espèce	Séquences	
HPRT	HPRT1	Homme, souris	AS	AGTTGAGAGATCATCTCCAC
			S	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
GPX2	GPX2	Homme	AS	TCCTTCAGGTAGGCGAAGAC
			S	CCCTTGCAACCAATTTGGAC
GRP78	HSPA5	Homme, souris	AS	ACGATCAGGGCAACCGCATCA
			S	CCACCTCCAATATCAACTTG
CHOP	DDIT3	Homme, souris	AS	CTCTGACTGGAATCTGGAGA
			S	CTGGAAGCCTGGTATGAGGA
IL6	Il6	souris	AS	TCCACGATTTCCCAGAGAAC
			S	AGTTGCCTTCTTGGGACTGAT
GPX2	Gpx2	souris	AS	CATAAGGGTAGGGCAGCTTG
			S	GCTTCCCTTGCAACCAGTTC
MCP1	Ccl2	souris	AS	ACTACAGCTTCTTTGGGACA
			S	TGGAGCATCCACGTGTTGGC

Annexe 2 Les anticorps primaires utilisés lors des expérimentations

Anticorps	Espèces	Dilution	Fournisseur
NF- κ B p65 phospho	Lapin	1/1000	Clinisciences
NF- κ B p65 total	Lapin	1/500	Clinisciences
I κ B phospho	Souris	1/200	Abcam
ApoB48	Lapin	1/500	Abcam
ACC phospho	Lapin	1/1000	Cell Signaling
ACC total	Lapin	1/500	Cell Signaling
β actine	Lapin	1/2000	Sigma
Anti-HNE	Lapin	1/1000	Calbiochem
Anti-HHE-Histidine	Souris	1/1000	CosmoBio